



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΣΤΕΡΕΑΣ ΕΛΛΑΔΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ  
ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗ**

**ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΩΝ  
ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΗΣ ΔΕΣΜΕΥΟΥΣΑΣ ΣΦΑΙΡΙΝΗΣ ΤΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ  
ΤΟΥ ΦΥΛΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ CYP11A, ΜΕ ΤΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ  
ΤΩΝ ΠΟΛΥΚΥΣΤΙΚΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ**

**Βάτσιου Αλεξάνδρα**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ  
Υπεύθυνοι  
Μπράλιου Γεωργία  
Διδάσκουσα Π.Δ. 407  
Μπάγκος Παντελής  
Επίκουρος Καθηγητής**

**Λαμία, 2011**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	2
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT.....	6
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	7
1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.2 ΩΟΘΗΚΗ.....	8
1.2.1 ΟΡΙΣΜΟΣ.....	8
1.2.2 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ.....	10
1.2.3 ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ.....	11
1.2.4 ΣΤΕΡΟΕΙΔΗΣ ΟΡΜΟΝΕΣ ΤΟΥ ΦΥΛΟΥ.....	12
1.2.5 ΟΡΜΟΝΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ.....	13
1.3 ΤΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΤΩΝ ΠΟΛΥΚΥΣΤΙΚΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ.....	17
1.3.1 ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΤΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ ΤΩΝ ΠΟΛΥΚΥΣΤΙΚΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ.....	17
1.3.2 ΤΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΤΩΝ ΠΟΛΥΚΥΣΤΙΚΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ.....	17
1.3.3 ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ ΤΩΝ ΠΟΛΥΚΥΣΤΙΚΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ.....	18
1.3.4 ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ -ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ.....	19
1.3.5 ΔΙΑΓΝΩΣΗ.....	20
1.3.6 ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ.....	21
1.4 ΓΟΝΙΔΙΑ-ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ.....	23
1.4.1 ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ SHBG (Sex Hormone Binding Globulin).....	23
1.4.2 ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ CYP11a.....	25
1.5 ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ.....	28
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	31
2.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ.....	32
2.2 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΟ ΠΑΚΕΤΟ (STATA 10).....	34
2.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ.....	36
2.3.1 ΜΟΝΤΕΛΟ ΣΤΑΘΕΡΩΝ ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ (fixed -effect model).....	36
2.3.2 ΜΟΝΤΕΛΟ ΤΥΧΑΙΩΝ ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ (random effect-model).....	37
2.4 ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΤΕΡΟΓΕΝΕΙΑΣ.....	39
2.5 ΜΕΓΕΘΟΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ (Effect Size).....	41
2.6 ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗΣ.....	46

2.7 ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ.....	48
ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟΤΗΤΑΣ .....	48
2.8 ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ .....	51
2.9 ΑΘΡΟΙΣΤΙΚΗ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ .....	56
2.10 ΑΦΑΙΡΕΤΙΚΗ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ.....	59
2.11 ΙΣΣΟΡΟΠΙΑ Hardy-Weinberg (HWE).....	60
2.12 ΕΛΕΓΧΟΣ T-TEST .....	62
2.13 ΜΕΤΑ-REGRESSION .....	64
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	67
3.1 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ (ΤΑΑΑΑ) <sub>n</sub> ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ SHBG .....	68
3.2 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ (ΤΤΤΤΑ) <sub>n</sub> ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ CYP11a .....	85
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4:.....	103
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ –ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	103
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	109
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 : ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	120

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Πανεπιστήμιο Ελλάδος στο Τμήμα Πληροφορικής με Εφαρμογές στη Βιοϊατρική κατά την διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2010-2011, υπο τη επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή κου.Μπάγκου Παντελή και της διδάσκουσας σύμφωνα με το ΠΔ 407/80 κας.Μπράλιου Γεωργίας.

Η εργασία αυτή υποδηλώνει το τέλος της φοίτησής μου και την ολοκλήρωση του κύκλου των προπτυχιακών σπουδών μου. Η διπλωματική αυτή εργασία αποτελεί την πρώτη, ουσιαστικά, επαφή μου με το πεδίο της έρευνας. Θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον κο.Μπάγκο και στη κα.Μπράλιου τόσο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν εξ'αρχής και με επέλεξαν για να συνεργαστώ μαζί τους όσο και για την αμέριστη βοήθεια και καθοδήγηση που μου παρείχαν. Αισθάνομαι ιδιαίτερα τυχερή που μου δόθηκε η ευκαιρία να συνεργαστώ μαζί τους, ήταν πάντοτε παρόντες όταν τους χρειαζόμουν να με ενθαρρύνουν και να μου δίνουν συμβουλές. Η συμβολή τους ήταν καθοριστική για να αγαπήσω ακόμη περισσότερο τον τομέα της Βιοπληροφορικής, ενισχύοντας την επιθυμία μου να ασχοληθώ με τον τομέα αυτό.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τη Νίκη Δήμου και τη Παναγιώτα Κοντού για τη συμβολή και τη βοήθεια που προσέφεραν. Τέλος, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την οικογένεια μου για το ενδιαφέρον, την αγάπη και την κατανόηση και την υποστήριξη που μου παρείχαν καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (Polycystic Ovarian Syndrome – PCOS) είναι μια ανωμαλία της λειτουργίας των ωοθηκών και η πιο συχνή ενδοκρινοπάθεια, με μεγάλη ετερογένεια στα συμπτώματα των ασθενών. Σκοπός μας είναι να εξετάσουμε το ρόλο του πολυμορφισμού (TAAAA)<sub>n</sub> του γονιδίου SHBG (Sex Hormone Binding Globulin) και του πολυμορφισμού (TTTTA)<sub>n</sub> του γονιδίου CYP11a στην εμφάνιση του συνδρόμου των πολυκυστικών ωοθηκών. Η μέθοδος που χρησιμοποιούμε είναι η μετα-ανάλυση, η οποία αποτελεί ένα στατιστικό εργαλείο που συνδυάζει πληροφορίες από σχετιζόμενες αλλά ανεξάρτητες μελέτες και παρέχει αποτελέσματα για την συσχέτιση των πολυμορφισμών των γονιδίων με την ασθένεια. Η μετα-ανάλυση πραγματοποιήθηκε με 3041 υγιείς και 2122 ασθενείς. Συσχέτιση παρουσιάστηκε μεταξύ του πολυμορφισμού επαναλήψεων (TAAAA)<sub>n</sub> του γονιδίου SHBG με το PCOS. Βρέθηκε ότι η ασθένεια κληρονομείται μέσω του πολυμορφισμού με συνεπικρατή τρόπο, οπότε και η σύγκριση των αλληλομόρφων (L vs S) έχει μεγαλύτερη βαρύτητα. Επειδή παρουσιάστηκε το φαινόμενο του Πρωτέα υπάρχει πιθανότητα η συσχέτιση πολυμορφισμού με το PCOS να είναι υπερεκτιμημένη λόγω της αρχικής μελέτης. Επιπλέον, παρουσιάστηκε ισχυρή ένδειξη για συσχέτιση ( $p=0.065$ ) του γονοτύπου 6/6 του πολυμορφισμού επαναλήψεων (TTTTA)<sub>n</sub> του γονιδίου CYP11a σε σχέση με τον 4/6 με το σύνδρομο PCOS. Επειδή ήταν εμφανές το φαινόμενο του Πρωτέα καθώς και στατιστικά σημαντική ετερογένεια, υπάρχει πάλι πιθανότητα για υπερεκτιμημένο αποτέλεσμα συσχέτισης. Τέλος, έγινε προσπάθεια εκτίμησης του βαθμού συσχέτισης των δύο πολυμορφισμών με τα βιοχημικά χαρακτηριστικά και το PCOS. Ο πολυμορφισμός (TAAAA)<sub>n</sub> του SHBG φαίνεται να βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης με άλλον πολυμορφισμό λόγω των αντίθετων, από τις αναμενόμενες, κλίσεων των ευθειών στον έλεγχο της μετα-παλινδρόμησης.

ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ: SHBG (Sex Hormone Binding Globulin), CYP11a, PCOS (Polycystic Ovarian Syndrome), meta-analysis

## ABSTRACT

POLYCYSTIC OVARY SYNDROME (PCOS) is an anomaly in the function of ovaries with heterogenous symptoms, and it is the most common endocrine disorder in women of reproductive age. The purpose of this study is to investigate the association of the (TAAAA)<sub>n</sub> repeat polymorphism of SHBG gene and the (TTTTA)<sub>n</sub> repeat polymorphism of CYP11a gene with PCOS. The method that we used is meta-analysis. It is a statistical tool that involves combining summary information from related but independent studies and gives an overall result of the association between the polymorphism and the risk for disease. Meta-analysis was executed with 3041 controls and 2122 cases. We found that (TAAAA)<sub>n</sub> polymorphism is significantly associated with PCOS. Our results indicate that PCOS is inherited through (via) (TAAAA)<sub>n</sub> polymorphism in a co-dominant way, and thus comparison of alleles (L vs S) is the most crucial (OR: 1.26, 95% CI: 1.05, 1.50). Since evidence for Proteus Phenomenon was appeared, the degree of genetic association is probably overestimated. Furthermore, according to multivariate analysis, a strong association was appeared of genotype 6/6 of CYP11a gene as compared to genotype 4/6, with PCOS (p=0.065). Because evidence for both heterogeneity and the Proteus phenomenon was found, the resulted association could be overestimated. Finally, we tried to appreciate the degree of association of the two polymorphisms with biochemical characteristics and PCOS. The opposite inclinations of the linears (as compared to expected) of the biochemical characteristics of (TAAAA)<sub>n</sub> polymorphism, in meta-regression analysis, suggest that there is a linkage disequilibrium between this and another SHBG gene polymorphism.

**KEY-WORDS:** SHBG (Sex Hormone Binding Globulin), CYP11a, PCOS (Polycystic Ovarian Syndrome), meta-analysis

# **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 1.1 Εισαγωγή

Οι πολυκυστικές ωοθήκες αποτελούν σήμερα ένα συχνό φαινόμενο που παρουσιάζεται στις γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας. Σε ένα μεγάλο ποσοστό γυναικών το ωοθυλάκιο δεν σπάει στο μέσο του έμμηνου κύκλου, με αποτέλεσμα την δημιουργία κύστεων. Σε περίπτωση που το πρόβλημα αυτό συνεχιστεί οι ωοθήκες μετατρέπονται σε πολυκυστικές. Μπορεί να εμφανίζεται είτε στη μία ή και στις δύο ωοθήκες. Η ύπαρξη πολυκυστικών ωοθηκών αγνοείται συχνά από τις γυναίκες καθώς τα συμπτώματα δεν είναι πάντα ιδιαίτερα εμφανή.

Σε αντίθεση το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών παρουσιάζει ένα εύρος συμπτωμάτων που συχνά διαφέρουν από άτομο σε άτομο. Το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών είναι το πιο συνηθισμένο ορμονικό πρόβλημα στις γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας. Εκτιμάται ότι ένα ποσοστό του 6% με 7% (Diamanti-Kandarakis et al. 1999; Azziz et al. 2004)(Asuncion et al. 2000) παρουσιάζει το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών.

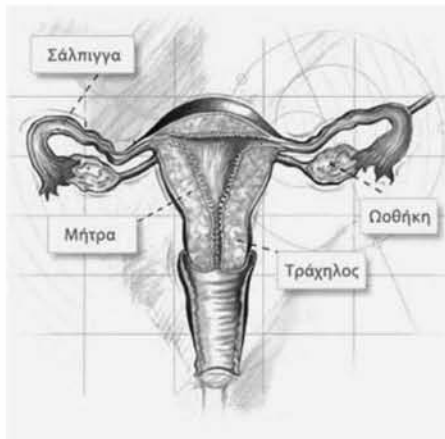
## 1.2 Ωοθήκη

### 1.2.1 Ορισμός

Οι ωοθήκες ή θηλυκές γονάδες, ως τα πρωταρχικά αναπαραγωγικά όργανα των θήλεων εκτελούν τη διπλή λειτουργία της παραγωγής ωαρίων και της έκκρισης των στεροειδών ορμονών του φύλου όπως τα οιστρογόνα (κυρίως οιστραδιόλη) και προγεστερόνης. Οι ωοθήκες περιβάλλονται χαλαρά από την σάλπιγγα, που προς την πλευρά της ωοθήκης διαθέτει κροσσούς όπως φαίνεται στην Εικόνα 1. Με αυτόν τον τρόπο τα ωάρια οδηγούνται στον ωαγωγό. Οι σάλπιγγες συνδέονται με την μήτρα που μέσω του τραχήλου συνδέεται με τον κόλπο (McGeown; Sherwood). Σε ένα φυσιολογικό κύκλο, μετά την έμμηνο ρύση αρχίζει η ανάπτυξη ενός ωοθυλακίου σε μια από της δύο ωοθήκες της γυναίκας. Κάτω από την επίδραση των ορμονών, που φυσιολογικά παράγουν οι ωοθήκες, το ωοθυλάκιο αναπτύσσεται μέχρι την 12-16 μέρα του κύκλου υπό φυσιολογικές συνθήκες. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται ωορρηξία. Σε πολλές γυναίκες όμως η διαδικασία αυτή γίνεται κατά το ήμισυ. Πιθανώς επειδή η δράση των ορμονών δεν είναι σωστή, το θυλάκιο δεν σπάει με

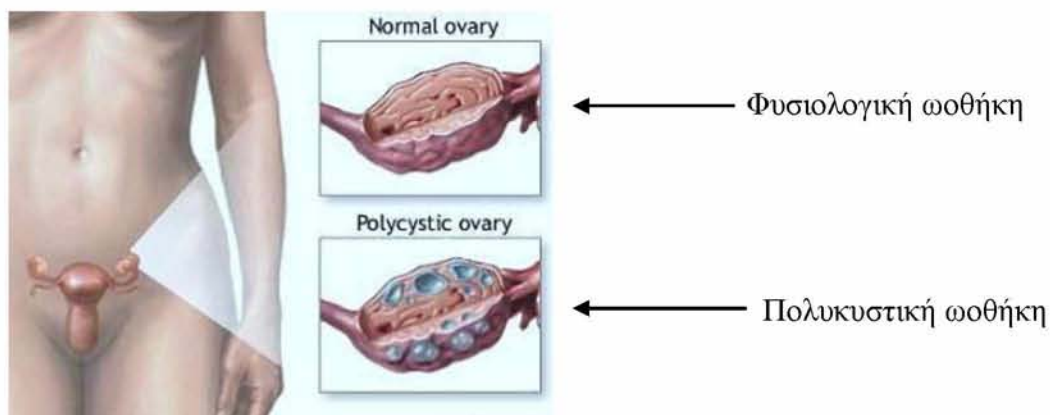


αποτέλεσμα να δημιουργείται μια μικρή κύστη. Σε περίπτωση που αυτό συμβαίνει κάθε μήνα δημιουργείται μια πολυκυστική ωοθήκη όπως φαίνεται στην Εικόνα 2. Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία τα κριτήρια που πληρούν την ειδικότητα και ευαισθησία για να καθοριστεί σε ένα υπερηχογράφημα η ύπαρξη πολυκυστικών



ωοθηκών (PCO) είναι η παρουσία 12 ή περισσότερων ωοθυλακίων σε κάθε ωοθήκη διαμέτρου 2-9 mm ή / και αύξηση του όγκου των ωοθηκών ( $> 10 \text{ cm}^3$ ). (Balen, et al. 2003; Jonard et al. 2003)

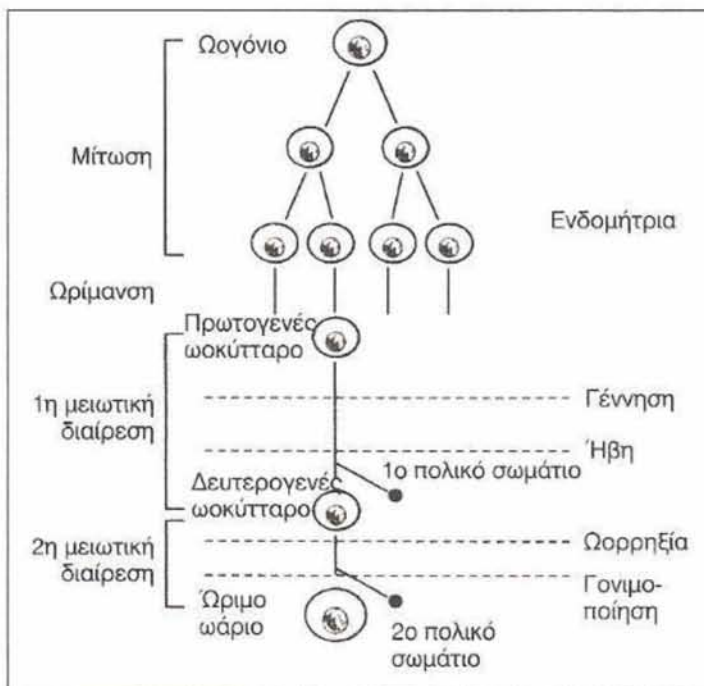
**Εικόνα 1: Ανατομία της μήτρας**



**Εικόνα 2: Απεικόνιση φυσιολογικής και πολυκυστικής ωοθήκης.**

## 1.2.2 Λειτουργία των ωοθηκών

Η πρόδρομη μορφή του ωαρίου ονομάζεται ωογόνιο. Τα ωογόνια πολλαπλασιάζονται με μίτωση και ωριμάζουν σε πρωτογενή ωοκύτταρα. Ο πολλαπλασιασμός αυτός συμβαίνει μόνο στην ενδομήτρια ζωή. Πριν την γέννηση κάθε πρωτογενές ωοκύτταρο περιβάλλεται από ένα στρώμα κοκκιωδών κυττάρων, που ονομάζεται πρωτογενές ωοθυλάκιο. Κατά την γέννηση μόνο  $2 \times 10^6$  πρωτογενή ωοθυλάκια παραμένουν, καθένα από τα οποία περιέχει ένα πρωταρχικό ωοκύτταρο ικανό να παράγει ένα ωάριο. Τα πρωτογενή ωοθυλάκια υφίστανται αύξηση δημιουργώντας τα ωοθυλάκια. Τα ωοθυλάκια είτε ωριμάζουν και οδηγούνται σε ωορρηξία είτε εκφυλίζονται και δημιουργούν έναν ιστό, μια διαδικασία γνωστή ως ατρησία (γενετικά προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ή απόπτωση). Μέχρι την εφηβεία και λίγα χρόνια αργότερα τα ωοθυλάκια που αναπτύσσονται για να ωριμάσουν υφίστανται ατρησία. Μόνο 400-500 ωριμάζουν και έχουν την ικανότητα να απελευθερώσουν το ωάριο (O. Faiz).



**Εικόνα 3:** Συνοπτική παρουσίαση της διαδικασίας ανάπτυξης ενός ωαρίου.

Η κυτταρική διαίρεση με την διαδικασία της μείωσης στα πρωτογενή ωοκύτταρα ξεκινά πριν την γέννηση, αλλά δεν ολοκληρώνεται. Η διαδικασία αναστέλλεται και ολοκληρώνεται στην ήβη με την πρώτη μειωτική διαίρεση που οδηγεί στη δημιουργία του δευτερογενούς ωοκυττάρου (απλοειδές κύτταρο). Το δευτερογενές ωοκύτταρο παράγεται από το πρωτογενές ωοκύτταρο και απελευθερώνει ένα μικρό πολικό

σωμάτιο που ορίζεται από τα χρωμοσώματα. Η ωρίμανση του δευτερογενούς ωοκυττάρου γίνεται πριν την ωορρηξία και η δεύτερη

μειωτική διαίρεση ολοκληρώνεται μόνο όταν το ωάριο γονιμοποιηθεί (Εικόνα 3). Έτσι, μία δεύτερη διαίρεση του κυττάρου (22 αυτοσωμικά χρωμοσώματα και 1 χρωμόσωμα φύλλου) οδηγούν στην δημιουργία του πλήρους ώριμου ωοκυττάρου και ενός δεύτερου πολικού σωματίου. (McGeown; Sherwood)

### 1.2.3 Αναπαραγωγική λειτουργία των ωοθηκών

Κατά την διάρκεια της αναπαραγωγικής ζωής το αναπαραγωγικό σύστημα της γυναίκας αναπτύσσεται και παλινδρομεί με κυκλικό τρόπο όπου κάθε κύκλος διαρκεί περίπου 28 ημέρες. Αποτελείται από την ωοθυλακική φάση που διαρκεί 14 ημέρες και από την ωχρινική φάση που διαρκεί επίσης 14 ημέρες. (McGeown; Sherwood)

#### Ωοθυλακική φάση

Τα κοκκιώδη κύτταρα που περιβάλλουν το πρωτογενές ωοκύτταρο, πολλαπλασιάζονται, δημιουργούν το άντρο και εκκρίνουν υγρό που γεμίζουν. Το άντρο σε συνδυασμό με μια ζελατινώδη στοιβάδα βλεννοπολυσακχαριτών σχηματίζουν την διαυγή ζώνη στο ωοθυλάκιο. Παράλληλα το ωοκύτταρο μεγαλώνει και κύτταρα ιστών σε συνδυασμό με τα κοκκιώδη κύτταρα διαφοροποιούνται σε κύτταρα θήκης (thecal cells). Το σύνολο των κυττάρων της θήκης και τα κοκκιώδη κύτταρα, γνωστά ως θυλακιώδη κύτταρα δρουν σαν ένα για την έκκριση οιστρογόνων. Μετά από 7-10 ημέρες, επικρατεί ένα ωοθυλάκιο, το οποίο αναπτύσσεται περαιτέρω, ενώ σταματά η ανάπτυξη των υπολοίπων. Το ωοκύτταρο έχει φτάσει στο μέγιστο μέγεθός του την στιγμή που αρχίζει να σχηματίζεται το άντρο. Την 14<sup>η</sup> ημέρα το ωοθυλάκιο υφίσταται ρήξη και το ωάριο απελευθερώνεται (δευτερογενές ωοκύτταρο).

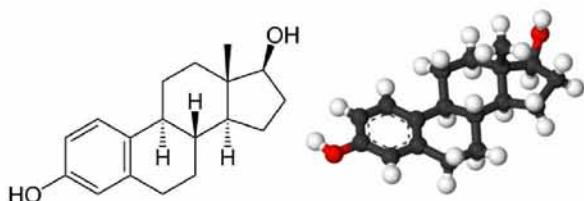
#### Ωχρινική φάση

Μετά την ωορρηξία, το ωοθυλάκιο κλείνει και μετασχηματίζεται σε *ωχρο σωματίο*. Εάν το ωάριο δεν γονιμοποιηθεί ή το γονιμοποιημένο ωάριο αποτύχει να εμφυτευτεί στο ενδομήτριο, μετά από 10 ημέρες περίπου, το ωχρο σωματίο εκφυλίζεται και μια νέα σειρά πρωτογενών ωοθυλακίων αρχίζει να αναπτύσσεται.

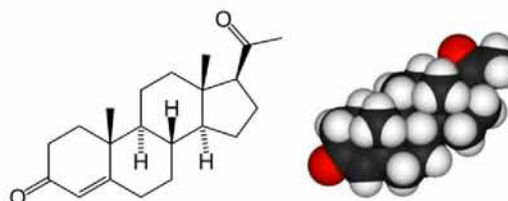
## 1.2.4 Στεροειδείς ορμόνες του φύλου

Για την πλήρη κατανόηση της αναπαραγωγικής λειτουργίας των ωοθηκών θα αναφερθούμε αρχικά στις στεροειδείς ορμόνες του φύλου που παίζουν κύριο ρόλο στο ορμονικό έλεγχο.

### Οιστραδιόλη



### Προγεστερόνη



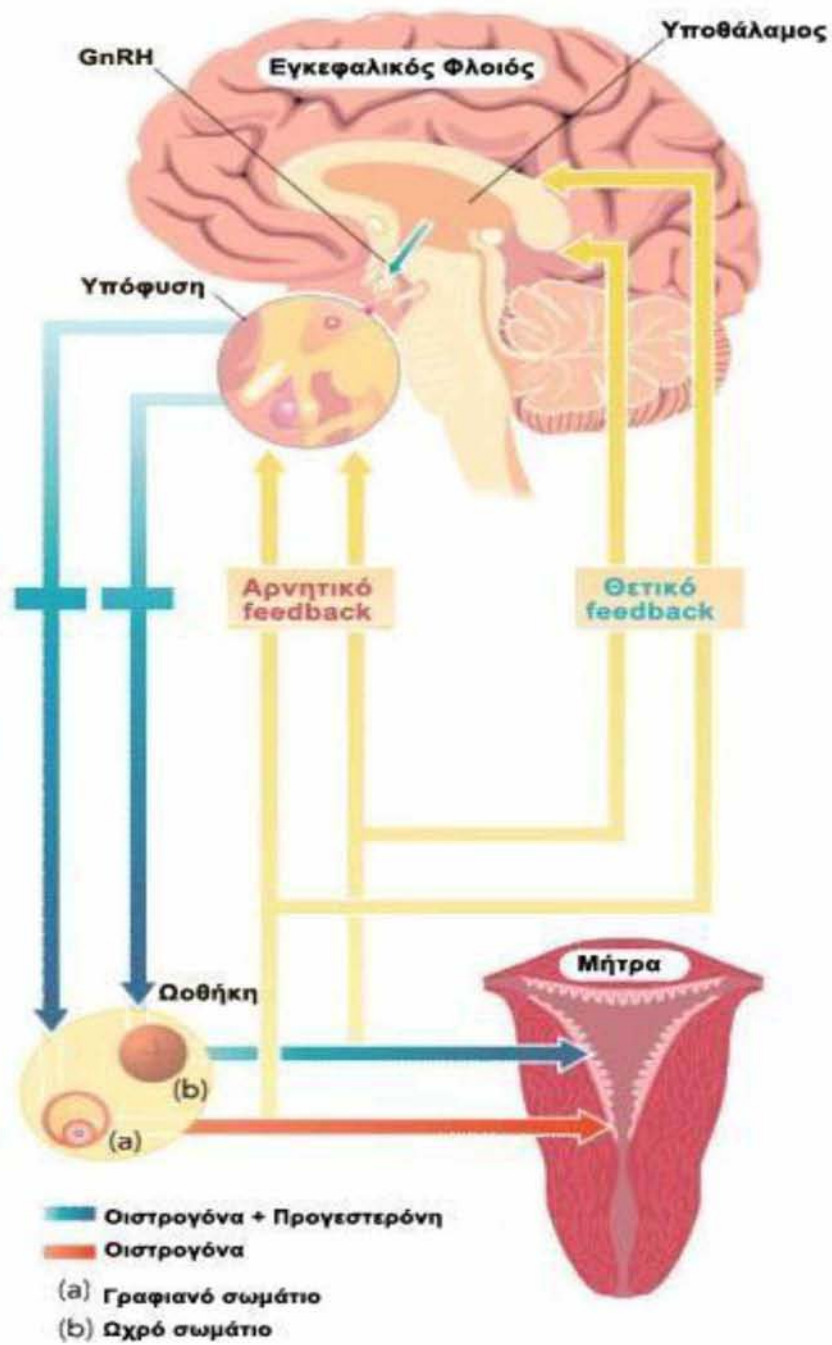
Η οιστραδιόλη εκκρίνεται από τις ωοθήκες και σε μικρότερο βαθμό από τα επινεφρίδια. Κυκλοφορεί στο αίμα ενωμένη με πρωτεΐνες και ιδιαίτερα με την σφαιρίνη που συνδέει τις ορμόνες του φύλου (SHBG). Η συγκέντρωση της οιστραδιόλης στο πλάσμα του αίματος ποικίλει ευρέως κατά την διάρκεια του έμμηνου κύκλου. Η ίδια η οιστραδιόλη διεγείρει τη σύνθεση της SHBG. Είναι υπεύθυνη για τα δευτερογενή χαρακτηριστικά του θήλεος, τη διέγερση ανάπτυξης του ωοθυλακίου, την ανάπτυξη του ενδομητρίου και την μεταφορά του σπέρματος από τον κόλπο στις σάλπιγγες. Η οιστραδιόλη βοηθά στη διαμόρφωση των κατάλληλων συνθηκών που είναι απαραίτητες για την διατήρηση της κύησης μετά την εμφύτευση στο ενδομήτριο και προάγει την ανάπτυξη των μαστών κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης διεγείροντας την ανάπτυξη των γαλακτοφόρων πόρων (P.Kalrson) ((Sherwood).

Η προγεστερόνη εκκρίνεται κατά το δεύτερο ήμισυ του κύκλου. Η ορμόνη αυτή κυκλοφορεί στο αίμα και επηρεάζει ολόκληρο το σώμα. Έχει πολλαπλές δράσεις καθώς βοηθά στην καλύτερη οργάνωση του ενδομητρίου ώστε να είναι κατάλληλο για την εμφύτευση του γονιμοποιημένου ωαρίου, ενώ παράλληλα εμποδίζει την ωρίμανση άλλων ωοκυττάρων. Προάγει την ανάπτυξη των μαστών, τόσο στην ήβη όσο και στην εγκυμοσύνη, διεγείροντας τον σχηματισμό εκκριτικών λοβιδίων. (McGeown; Sherwood)

### 1.2.5 Ορμονικός έλεγχος

Το μεγαλύτερο μέρος της ρύθμισης της παραγωγής των ορμονών στις ωοθήκες ελέγχεται από τις “τροπικές” ορμόνες που μπορούν να επηρεάσουν την έκκριση άλλων ορμονών της πρόσθιας υπόφυσης (Εικόνα 4). Ανάμεσα στις ορμόνες της πρόσθιας υπόφυσης (αδενοϋπόφυση) είναι η θυλακιοτροπίνη ή θυλακιοτρόπος ορμόνη (FSH) και η ωχρινοτροπίνη ή ωχρινοτρόπος ορμόνη (LH). Η LH συνεργάζεται με την FSH και διεγείρουν την παραγωγή οιστρογόνων και προεγεστερόνης από τις ωοθήκες των γυναικών. Η έκκριση της εκλυτικής ορμόνης των γοναδοτροπινών (gonadotropin releasing hormone (GnRH)) από τον υποθάλαμο επηρεάζει την έκκριση της θυλακιοτρόπου ορμόνης (follicle stimulating hormone (FSH)) και την έκκριση της ωχρινοτρόπου ορμόνης (luteinizing hormone (LH)) καθώς και οι δύο εκλύονται από τα γοναδοτρόπα κύτταρα (Martin 1985).

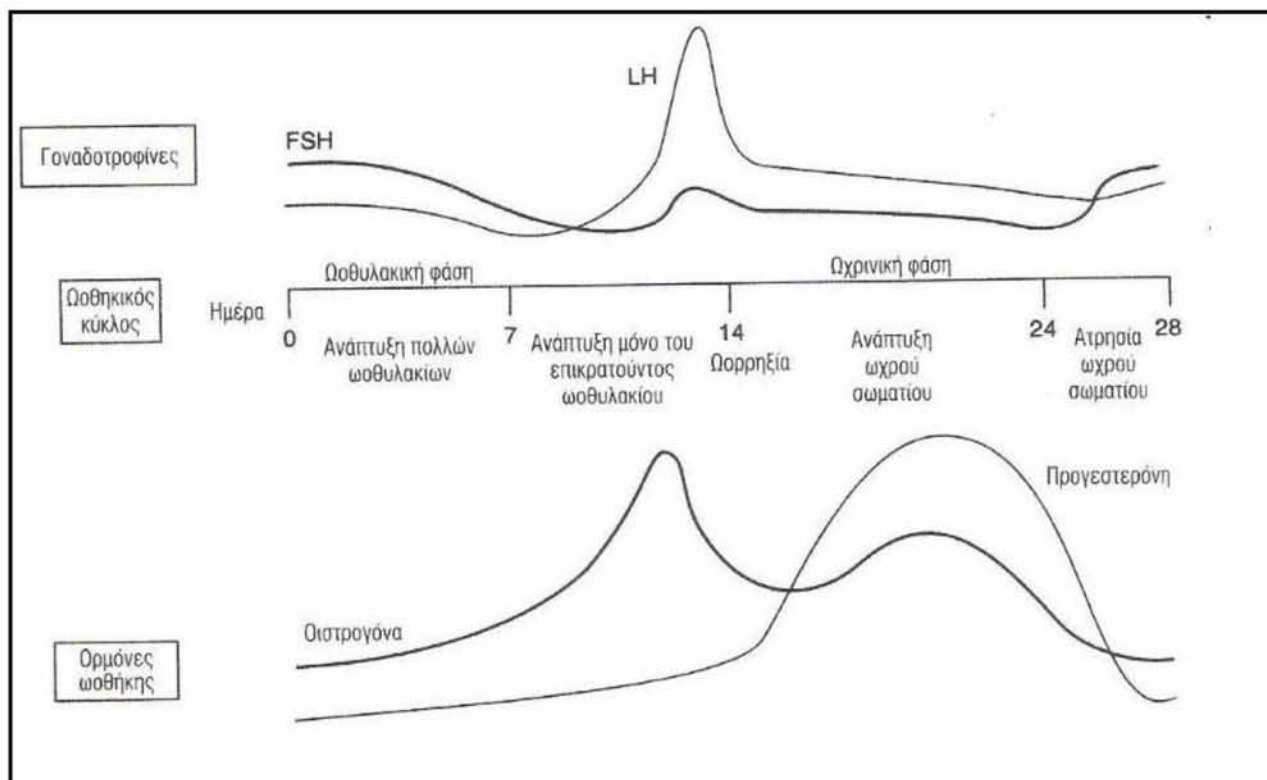




Εικόνα 4: Ο ορμονικός άξονας υποθαλάμου- υπόφυσης

Παρόλο που η GnRH είναι απαραίτητη για την έκκριση της FSH και LH, σημαντική είναι και η δευτερογενής ρύθμισή τους από την οιστραδιόλη, την τεστοστερόνη και από πεπτίδια που συνθέτουν οι γονάδες, όπως είναι η ινχιμίνη (Baynes). Τα οιστρογόνα παράγονται τόσο από τα κοκκιώδη κύτταρα όσο και τα κύτταρα θήκης. Η μετατροπή της χοληστερόλης σε οιστρογόνα απαιτεί έναν αριθμό συνεχόμενων βημάτων, το τελευταίο από τα οποία είναι η μετατροπή των ανδρογόνων σε οιστρογόνα. Τα κύτταρα θήκης παράγουν ανδρογόνα αλλά έχουν μειωμένη ικανότητα να τα μετατρέψουν σε οιστρογόνα. Αντίθετα τα κοκκιώδη κύτταρα περιέχουν το ένζυμο αρωμάτιση που μπορούν να μετατρέψουν τα ανδρογόνα σε οιστρογόνα (Sherwood). Στην γυναίκα η έκκριση LH και FSH μεταβάλλεται ανάλογα με το στάδιο του εμμηνορρυσιακού κύκλου. Στην ωοθυλακική φάση τα επίπεδα των οιστρογόνων είναι χαμηλά, έτσι ασκούν περιορισμένη καταστολή της έκκρισης LH ενώ τα επίπεδα της FSH είναι υψηλότερα. Η FSH δρα στα κοκκιώδη κύτταρα για να προάγει την μετατροπή των ανδρογόνων της θήκης σε οιστρογόνα (κυρίως οιστραδιόλη). Η αύξηση της οιστραδιόλης προάγει την ανάπτυξη του ενδομητρίου. Στο μέσο του κύκλου η αύξηση της οιστραδιόλης διεγείρει την έκκρισή της LH και το σύστημα μεταπίπτει από αρνητική σε θετική ρύθμιση. Η LH δρα στα εσωτερικά κύτταρα θήκης των αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων για να διεγείρει την παραγωγή ανδρογόνων ενώ η ινχιμίνη αναστέλλει την δράση της FSH (Sherwood). Η αύξηση της LH προκαλεί ρήξη του τοιχώματος του αναπτυσσόμενου ωοθυλακίου. Μετά την ωορρηξία τα κύτταρα της θήκης του ωοθυλακίου που έχουν υποστεί ρήξη ατροφούν (συρρικνώνονται) και τα κοκκιώδη κύτταρα αναπτύσσονται για να δημιουργήσουν το ωχρό σωματίο που παράγει προγεστερόνη. Το ωχρό σωματίο σε περίπτωση που δεν πραγματοποιηθεί γονιμοποίηση υφίσταται εκφύλιση μετά από 14 ημέρες λόγω της μειωμένης έκκρισης της LH. Στην Εικόνα 5 παρουσιάζονται στο κάτω διάγραμμα οι μεταβολές των ορμονών της ωοθήκης (οιστρογόνα και προγεστερόνη) ενώ στο επάνω διάγραμμα οι μεταβολές της συγκέντρωσης της ωχρινότροπου και της θυλακιοτρόπου ορμόνης στο πλάσμα του αίματος κατά την διάρκεια του έμμηνου κύκλου (O. Faiz).

Εικόνα 5: Μεταβολές των ορμονών της ωοθήκης





## **1.3 Το Σύνδρομο των Πολυκυστικών Ωοθηκών**

### **1.3.1 Ιστορία της διάγνωσης του Συνδρόμου των Πολυκυστικών Ωοθηκών**

Από το 1844, ο Chereau περιγράφει τις σκληροκυστικές αλλαγές στην ανθρώπινη ωοθήκη. Η σχέση μεταξύ της παχυσαρκίας, των διαταραχών της εμμήνου ρύσεως, της υπερανδρογοναιμίας και των πολυκυστικών ωοθηκών αρχικά περιγράφηκε από τους Stein και Leventhal (1935) και επιβεβαιώθηκε στη συνέχεια και από πολλούς άλλους συγγραφείς. (Pasquali, Casimirri et al. 1997) Οι αυξημένες συγκεντρώσεις της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH) αναφέρθηκαν για πρώτη φορά το 1958, δημιουργώντας ένα κριτήριο για τη διάγνωση του συνδρόμου των πολυκυστικών ωοθηκών, βασισμένο σε βιοχημικά δεδομένα. Αν και ήταν σαφές από το 1962 ότι υπήρχε ποικιλία στη κλινική εικόνα του συνδρόμου, το 1976 διατυπώθηκε η έννοια του PCOS με ανωμαλίες στον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης που οδηγούσαν σε έκκριση της γοναδοτρόπου ορμόνης (GnRH) με αποτέλεσμα την ακατάλληλη ανατροφοδότηση των οιστρογόνων (Rebar et al. 1976; Homburg 1996). Ταυτόχρονα την ίδια χρονολογία σταθμός για την διάγνωση αποτέλεσε η χρήση των υπερήχων. Αργότερα, περαιτέρω έρευνες έδειξαν τη σύνδεση του συνδρόμου με την αντίσταση στην ινσουλίνη. (Ioannidis et al.; Kahn, Flier et al. 1976; Burghen, Givens et al. 1980) όπου ανακαλύφθηκε ότι η υπερανδρογοναιμία σχετίζεται με την υπερινσουλιναιμία και ότι ο πολυμορφισμός IRS-1( Gly972Arg) της ινσουλίνης σχετίζεται με το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών.

### **1.3.2 Το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών**

Το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS) είναι μια γενετική ενδοκρινική διαταραχή των γυναικών που εμφανίζεται κυρίως στην αναπαραγωγική ηλικία (Taylor, McCourt et al. 1997; Azziz, Woods et al. 2004). Η κατανόηση του συνδρόμου των πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS) είναι δύσκολη καθώς δεν υπάρχει κλινικός καθολικά αποδεκτός ορισμός. Έχει δειχθεί ότι η ασθένεια είναι ένα σύνδρομο, στο οποίο ένα μόνο σύμπτωμα αδυνατεί για κλινική διάγνωση λόγω του ευρέως φάσματος των συμπτωμάτων. Τα κριτήρια διάγνωσης είναι: δυσλειτουργία

στην ωοθήκη (ολιγο-/ή ανωοθυλακιορρηξία, (όχι απαραίτητα χρόνια)), υπερανδρογοναιμία και εμφάνιση πολυκυστικών ωοθηκών [(Franks 2006)]. Οι διαφορετικοί ορισμοί και η ετερογένειά της επηρεάζουν τον επιπολασμό και την ανταπόκριση στη θεραπεία. (Legro 2003) (Diamanti-Kandarakis et al. 1999) Ο επιπολασμός της ασθένειας εκτιμάται ότι κυμαίνεται σε ποσοστό 6% με 7% (Diamanti-Kandarakis et al. 1999; Azziz et al. 2004)(Asuncion et al. 2000) αν και σε μερικούς πληθυσμούς της Ασίας το ποσοστό αυτό ήταν κατά πολύ μικρότερο 2,2%. (Chen et al. 2008)

### **1.3.3 Αιτιολογία του Συνδρόμου των Πολυκυστικών Ωοθηκών**

Η πολυπλοκότητα του συνδρόμου των πολυκυστικών ωοθηκών πηγάζει από την χαρακτηριστική ετερογένεια των συμπτωμάτων και την άγνωστη αιτιολογία του. Τα βιοχημικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου μπορεί να προκύψουν ως συνέπεια των γενετικά καθορισμένων υπερεκκρίσεων ανδρογόνων από την ωοθήκη κατά τη διάρκεια ή πολύ καιρό πριν την εφηβεία (Abbott et al. 2002). Η ύπαρξη ασθενών μεταξύ οικογενειών αποδεικνύει ότι *γενετικοί παράγοντες* παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην αιτιολογία του συνδρόμου (Franks et al. 1997). Η έλλειψη γενετικής σύνδεσης του συνδρόμου με ένα γονίδιο όμως αποδεικνύει την ακραία ετερογένεια και δυσκολία να επιτευχθεί παγκοσμίως μια αποδεκτή διάγνωση (Abbott et al. 2005). Πρόσφατες έρευνες προσδίδουν βάρος στην ιδέα ότι το PCOS αντιπροσωπεύει ένα σύνθετο γνώρισμα κατά το οποίο διάφορα γονίδια, αλλά ίσως και ένα σχετικά μικρό σύνολο βασικών γονιδίων συμβάλουν, σε συνδυασμό με περιβαλλοντικούς (κυρίως διατροφικούς) παράγοντες, στον ετερογενή φαινότυπο του PCOS. Παρ' όλα αυτά, η υπερανδρογοναιμία ως υπερτρίχωση ή αλωπεκία είναι ένα από τα πιο σταθερά χαρακτηριστικά που εκφράζονται στους ασθενείς με PCOS. (Franks et al. 1997; Franks et al. 1998). Η υπερβολική παραγωγή ανδρογόνων από τα κύτταρα της θήκης μπορεί να είναι αποτέλεσμα της αυξημένης έκφρασης των ενζύμων που συμμετέχουν στη σύνθεση των στεροειδών ορμονών (Nelson et al. 1999) και μπορούν κατά συνέπεια να οδηγήσουν σε άλλες κλινικές εκδηλώσεις του συνδρόμου, όπως η αναστολή της ανάπτυξης των ωοθυλακίων, η αντίσταση στην

ινσουλίνη, η παχυσαρκία, και ο καρκίνος του ενδομητρίου (Wickenheisser et al. 2000).

### 1.3.4 Κλινική Εικόνα-Συμπτώματα

Η αξιοσημείωτη ετερογένεια που χαρακτηρίζει το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών αποτελείται από ένα φάσμα συμπτωμάτων, το οποίο μπορεί να είναι διαφορετικό από άτομο σε άτομο και ίσως αλλάζει με το χρόνο. (Balen et al. 1995) Το σύνολο των συμπτωμάτων οδηγεί σε σοβαρές αναπαραγωγικές, ενδοκρινικές και μεταβολικές διαταραχές (Πίνακας 1) (Abbott et al. 2002; Balen and Michelmores 2002).

**Πίνακας 1:Σημαντικές διαταραχές της αναπαραγωγής, του μεταβολισμού και της γενικής υγείας που εκδηλώνονται σε γυναίκες που έχουν το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών.**

<b>Αναπαραγωγικές διαταραχές</b>
Πολυκυστικές ωοθήκες Υπερανδρογοναιμία (υπερτρίχωση, ακμή, αλωπεκία) Ανωορρηξία (αμηνόρροια, ολιγομηνόρροια) Υπερέκκριση της LH Αυξημένος κίνδυνος πρόωρης αποβολής
<b>Μεταβολικές διαταραχές</b>
Υπερινσουλιναιμία Μειωμένη έκκριση ινσουλίνης και διαβήτη τύπου II Παχυσαρκία Δυσλιπιδαιμία
<b>Διαταραχές της γενικής υγείας</b>
Αυξημένοι παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακές ασθένειες Καρκίνος του ενδομητρίου

Η μεγαλύτερη ενδοκρινική διαταραχή είναι η υπερβολική έκκριση ανδρογόνων που πιθανώς σχετίζεται με την ανώμαλη δραστηριότητα της ινσουλίνης και την αυξημένη συγκέντρωση της ωχρινότροπου ορμόνης (Homburg 1996; Norman et al. 2007). Η υπερανδρογοναιμία μπορεί να οδηγήσει σε δασυτριχισμό (αύξηση των τριχών του σώματος με κατανομή ανδρικού τύπου) και αλωπεκία (τέλεια έλλειψη ή και η αραίωση των τριχών της κεφαλής ή και του σώματος) ακόμη και ακμή. Η

καταστολή της έκκρισης των οιστρογόνων οδηγεί σε διαταραχή στη ρύθμιση της έκκρισης των γοναδοτροπινών από τον υποθάλαμο και κατ' επέκταση στη LH. Η αυξημένη LH μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα ένα φαύλο κύκλο χρόνιας ανοωρρηξίας, είτε αμηνόρροια (κατάσταση κατά την οποία δεν εμφανίζεται η έμμηνος ρύση για περισσότερο από 6 μήνες) είτε ολιγομηνόρροια (κατάσταση κατά την οποία η έμμηνος ρύση εμφανίζεται σε αραιά χρονικά διαστήματα) (Yen et al. 1970; Rebar et al. 1976).

Η υπερινσουλιναιμία (υψηλά επίπεδα ινσουλίνης στο αίμα) έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση του PCOS. Υπάρχουν νεαρές γυναίκες με αντίσταση στην ινσουλίνη και αντισταθμιστική υπερσουλιναιμία που εμφανίζουν αρρενοποίηση. Είναι μια ανωμαλία η οποία, αν και δεν σχετίζεται με το «μεταβολικό σύνδρομο», αυξάνει τον κίνδυνο της δυσλιπιδαιμίας. Με τον όρο δυσλιπιδαιμία εννοούμε την αύξηση τόσο της ολικής χοληστερόλης, LDL, των τριγλυκεριδίων όσο και την ελάττωση της HDL, των λιπιδίων και των λιποπρωτεϊνών. Η δυσλιπιδαιμία έχει ως αποτέλεσμα τον αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου και διαβήτη τύπου 2 στην μετέπειτα ζωή. (Dokras et al. 2005; Essah et al. 2007)

### 1.3.5 Διάγνωση

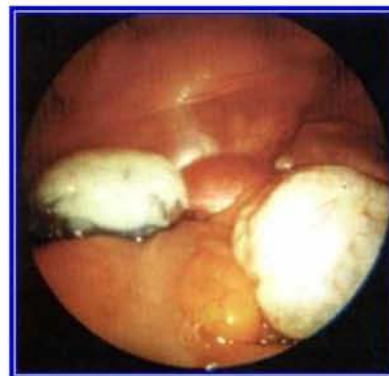
Λόγω της ετερογένειας των συμπτωμάτων του συνδρόμου είναι απαραίτητη η κατηγοριοποίηση των γυναικών με την ίδια συμπτωματολογία για την διεξαγωγή πιο ακριβών μελετών και για την απόκτηση μιας πιο σαφούς εικόνας του συνδρόμου. Η διάγνωση βασίζεται στο ιατρικό ιστορικό, στη φυσική εξέταση στις εργαστηριακές και στις ιατρικές εξετάσεις.

Απαραίτητα στάδια για την ολοκλήρωση της διάγνωσης του συνδρόμου είναι:

- Ιατρικό Ιστορικό (αλλαγές στην έμμηνο ρύση, στο βάρος, και άλλα συμπτώματα).
- Φυσική εξέταση (μέτρηση αρτηριακής πίεσης, μέτρηση του δείκτη μάζας σώματος (BMI), μέτρηση της περιμέτρου της μέσης, εντοπισμός ανδρικού τύπου τριχοφυΐας στο σώμα ή ακμής).
- Γυναικολογική εξέταση (έλεγχος διογκωμένων ωοθηκών από τον αυξημένο αριθμό μικρών κυστών).
- Εξετάσεις αίματος (αξιολόγηση των επιπέδων ανδρογόνων, χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων του αίματος).
- Κολπικό υπερηχογράφημα για την διάγνωση πολυκυστικών ωοθηκών και τον έλεγχο του ενδομητρίου.
- Λαπαροσκοπική εξέταση η οποία θα εμφανίσει διογκωμένες ωοθήκες, με λεία, λευκή εμφάνιση, όπως στην εικόνα (Εικόνα 6).

Πρέπει, επίσης να αποκλειστούν άλλες παθολογικές καταστάσεις που δίνουν παρόμοια συμπτώματα, όπως :

- Συγγενής υπερπλασία επινεφριδίων
- Σύνδρομο Cushing
- Όγκοι ωοθήκης
- Προλακτίνωμα
- Θυρεοειδοπάθειες



**Εικόνα 6:** Εικόνα ωοθηκών στο PCOS, με λαπαροσκόπηση.

### 1.3.6 Αντιμετώπιση

Δεδομένου ότι η βασική αιτία του συνδρόμου είναι ακόμα άγνωστη, μοναδική αντιμετώπιση για την θεραπεία του συνδρόμου δεν υπάρχει. Υπάρχουν ωστόσο μια πληθώρα αποτελεσματικών θεραπειών που καλύπτουν απλώς τα διάφορα παθολογικά συμπτώματα.

Ένας μεγάλος αριθμός γυναικών με σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS) είναι υπέρβαρες ή παχύσαρκες. Έτσι, η απώλεια βάρους αναμένεται ότι έχει πολλές ευεργετικές επιδράσεις σε κλινικές, ενδοκρινικές και μεταβολικές παραμέτρους των ασθενών. Η απώλεια βάρους σχετίζεται με μείωση των συγκεντρώσεων της ινσουλίνης και με αύξηση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη η οποία μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα τη βελτίωση της έμμηνου λειτουργίας και της γονιμότητας. Συνεπώς με την μείωση της υπερινσουλιναιμία μειώνονται οι πιθανότητες για την ανάπτυξη πιθανών μακροπρόθεσμων συνεπειών, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, η υπέρταση, οι καρδιαγγειακές και υπερλιπιδαιμικοί διαταραχές (Homburg 1996) (Pasquali et al. 1997). Σε ασθενείς ωστόσο με νοσηρή παχυσαρκία προτείνονται βαριατρικές χειρουργικές επεμβάσεις για την επίλυση του αυξημένου βάρους (Escobar-Morreale et al. 2005). Άλλοι τρόποι για την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων είναι με φαρμακολογική υποστήριξη. Στις περιπτώσεις που υπάρχουν υψηλές συγκεντρώσεις ινσουλίνης, η αντιμετώπιση μπορεί να γίνει με την διαζοξίνη (Moggetti et al. 2000). Η μετφορμίνη είναι ένα άλλο φάρμακο που χρησιμοποιείται συνήθως για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου 2, η οποία δρά κυρίως στο ήπαρ όπου μειώνει την γλυκονεογένεση (Kahal et al.). Η μετμορφίνη συμβάλλει στη βελτίωση της αντίστασης στην ινσουλίνη, της λειτουργίας της ωοθήκης, στη μείωση της ωχρινोटρόπου ορμόνης (LH), της ολικής τεστοστερόνης, της υπερανδρογοναιμίας, καθώς αυξάνει την FSH και την δεσμεύουσα πρωτεΐνη των ορμονών του φύλου, της SHBG (Kahal et al.; Moggetti et al. 2000; Fleming et al. 2002).

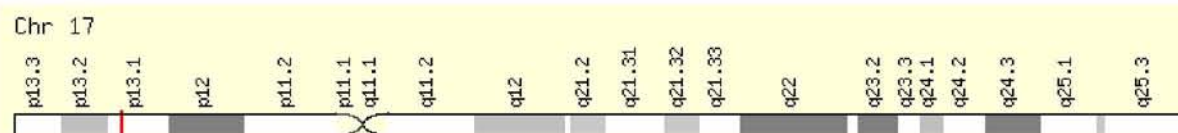
Η αντιμετώπιση με την χρήση αντισυλληπτικών είναι πολύ καλή θεραπεία για το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών. Αρχικά, τα αντισυλληπτικά δίνουν την δυνατότητα στην ασθενή να ρυθμίσει τον κύκλο της. Δεύτερον καταστέλλουν την ωοθηκική λειτουργία σε όσο χρονικό διάστημα γίνεται χρήση, μειώνοντας την παραγωγή ανδρογόνων, άρα μειώνοντας και την υπερανδρογοναιμία. Τρίτον δεν τα αφήνουν να δράσουν οπότε μειώνεται η ακμή και η τριχοφυΐα. Αυξάνεται δε ταυτόχρονα η SHBG, η σφαιρίνη η οποία δεσμεύει τα ανδρογόνα. Τέλος, περιέχουν προγεστερόνη, η οποία προστατεύει το ενδομήτριο.

## 1.4 Τα Γονίδια-Πολυμορφισμοί

### 1.4.1 Το γονίδιο SHBG (Sex Hormone Binding Globulin)

#### ΓΟΝΙΔΙΟ SHBG

Το γονίδιο SHBG έχει εντοπιστεί στη περιοχή p1.2 - p1.3 bp στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 17 (Berube, Seralini et al. 1990) με μήκος 3,2 kilobase (kb) του γονιδιωματικού DNA και αποτελείται από 8 εξώνια (Εικόνα 7) (Hammond et al. 1989). Ο υποκινητής του δεν περιέχει κουτί TATA ή CAAT (Gershagen et al. 1989), ενώ περιέχει θέσεις πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων όπως είναι ο HNF-4, ο COUP-TF και ο PPAR $\gamma$ . Έχει βρεθεί ότι οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες παίζουν καθοριστικό ρόλο στον έλεγχο της λειτουργίας του υποκινητή και στην παραγωγή της SHBG in vitro. Ο HNF-4 αυξάνει σημαντικά την μεταγραφή, ενώ ο COUP-TF και ο PPAR $\gamma$  in vivo καταστέλλουν την μεταγραφή του γονιδίου SHBG και κατ' επέκταση την έκφραση της πρωτεΐνης SHBG (Pugeat et al.; Janne and Hammond 1998).



Εικόνα 7: Το γονίδιο SHBG

#### ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ SHBG ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ

Τα ηπατοκύτταρα είναι η κύρια περιοχή της βιοσύνθεσης της SHBG που εκκρίνεται στο πλάσμα. Η βιοσύνθεση της SHBG επηρεάζεται από αλλαγές στα ίδια τα επίπεδα της πρωτεΐνης SHBG στο αίμα. Αλλαγές της SHBG στο αίμα μπορεί να οφείλονται σε ορμονικές, μεταβολικές (Selva et al. 2007) καθώς ακόμη και διατροφικές αιτίες (Hammond GL et al 1989), (Pugeat et al.). Η αύξηση της τεστοστερόνης οδηγεί σε ελάττωση της SHBG, ενώ αύξηση των οιστρογόνων αυξάνει τα επίπεδα της SHBG (Anderson 1974). Η SHBG μπορεί να παραχθεί εκτός από τα ηπατοκύτταρα και σε άλλους ιστούς όπως στους όρχεις στους άνδρες (Janne et al. 1998). Τα επίπεδα

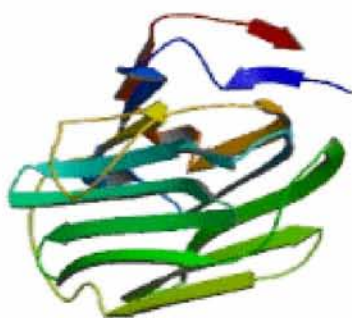


SHBG έχουν την τάση να μειώνονται ελαφρά στις γυναίκες και σημαντικά στον άνδρα με την αύξηση της ηλικίας μέχρι την ενηλικίωση (Sorensen et al. 2007).

#### ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ SHBG ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ

Η πρωτεΐνη αυτή κυκλοφορεί στο αίμα μαζί με την αλβουμίνη, την πιο άφθονη πρωτεΐνη του πλάσματος (Εικόνα 8) (Burton and Westphal 1972). Η δεσμευτική σφαιρίνη των ορμονών του φύλου του ανθρώπου (SHBG) είναι μια πολυλειτουργική ομοδιμερής (Grishkovskaya et al. 2000) γλυκοπρωτεΐνη του πλάσματος που αποτελείται από 373 αμινοξέα (Cousin et al. 2004).

Είναι η κύρια πρωτεΐνη μεταφοράς των στεροειδών ορμονών στο πλάσμα και ρυθμίζει την πρόσβαση στα κύτταρα-στόχους. Η γλυκοπρωτεΐνη αυτή δεσμεύει με μεγάλη συγγένεια ανδρογόνα, όπως η τεστοστερόνη (T) και η διϋδροτεστοστερόνη (DHT), και με μικρότερη συγγένεια την οιστραδιόλη (E2). Μεταβολές στη συγκέντρωση της SHBG οδηγούν σε αντίστοιχες μεταβολές στις συγκεντρώσεις ανδρογόνων και οιστρογόνων στο πλάσμα. Η αύξηση της τεστοστερόνης οδηγεί σε ελάττωση της SHBG, ενώ αύξηση των οιστρογόνων αυξάνει τα επίπεδα της SHBG (Anderson 1974). Τα χαμηλά επίπεδα δεσμευτικής σφαιρίνης (SHBG) στο αίμα, συνδέονται εκτός από την υπερινσουλιναμία, τον αυξημένο κίνδυνο για καρδιαγγειακή νόσο και διαβήτη τύπου 2 και με περίσσεια σωματικού λίπους και παχυσαρκία (Tchernof, Toth et al. 1999).



**Εικόνα 8: Η πρωτεΐνη SHBG.**



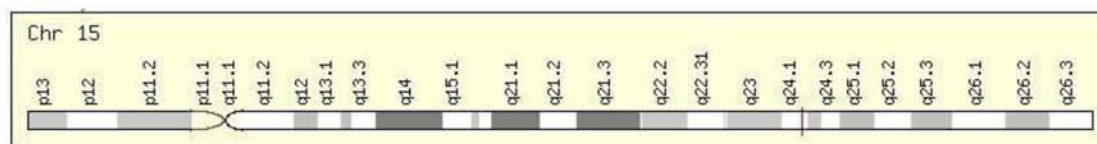
## ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ (TAAAA)<sub>n</sub> ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ SHBG

Στο 5' άκρο στον υποκινητή και στη θέση -829 έχει διαπιστωθεί ένας πολυμορφισμός (TAAAA)<sub>n</sub> μέσα στην ακολουθία *Alu*. (Hogevveen et al. 2001) Ο αριθμός των επαναλήψεων που έχουν βρεθεί κυμαίνεται από 6 έως 11 (Cousin, Calémard-Michel et al. 2004). Έχει δειχθεί ότι ο αριθμός των επαναλήψεων του πεντανουκλεοτιδίου (TAAAA) επηρεάζει τη μεταγραφική δραστηριότητα του υποκινητή του γονιδίου της SHBG του ανθρώπου στα κύτταρα HepG2 (ηπατοκύτταρα). Φαίνεται πιθανό ο πολυμορφισμός αυτός να επηρεάζει τα επίπεδα της SHBG στο πλάσμα. Αυτό μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα αλλαγές στα επίπεδα της SHBG στο πλάσμα (Hogevveen, Talikka et al. 2001). Αρκετές έρευνες έχουν γίνει του πολυμορφισμού αυτού με το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών με σκοπό την διεξαγωγή συμπεράσματος για την σύνδεση (Xita et al. 2003; Xita et al. 2008) και με την πυκνότητα των οστών στους άνδρες (Eriksson et al. 2006).

### 1.4.2 CYP11a

#### ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ CYP11a

Το γονίδιο CYP11a βρίσκεται στο χρωμόσωμα 15 και συγκεκριμένα στη θέση q2.3-q2.4 (Εικόνα 9) (Sparkes et al. 1991) . Το γονίδιο είναι τουλάχιστον 20 kb, και αποτελείται από 9 εξώνια. Διαθέτει μη συμβατικές TATA και CAT αλληλουχίες. Στον υποκινητή υπάρχουν θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων όπως GREB, deltaGREB, GR, GR-alpha, GR-beta που δεν έχει αποδειχθεί η λειτουργία τους in vivo.

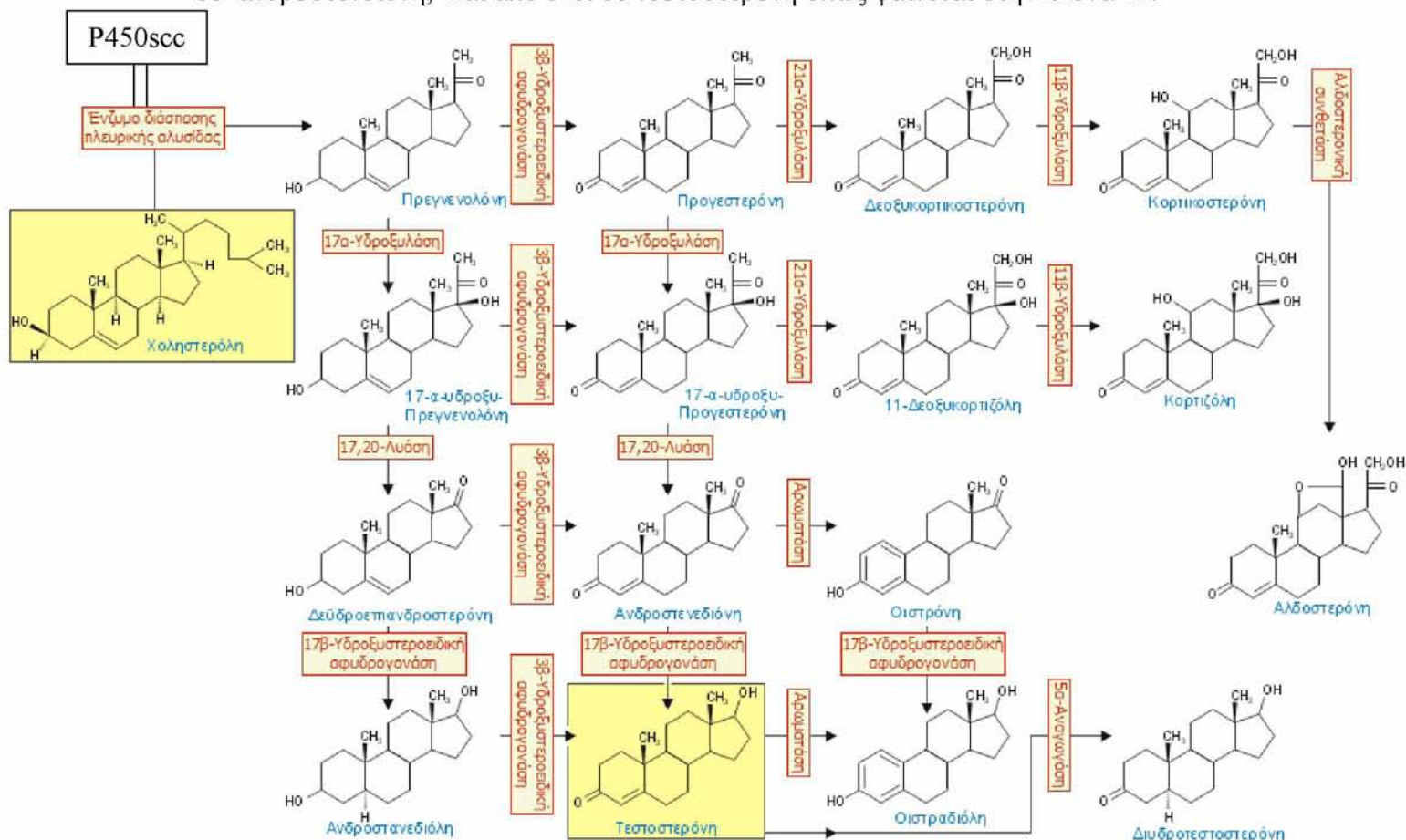


Εικόνα 9: Το γονίδιο CYP11a.

## ΤΟ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑ P450<sub>sc</sub> (ΓΟΝΙΔΙΟ CYP11a)

Στο φλοιό των επινεφριδίων, πέντε είναι τα είδη του κυτοχρώματος P-450 που καταλύουν τη μετατροπή της χοληστερόλης σε διάφορα κορτικοστεροειδή (Morohashi et al. 1992). Το γονίδιο CYP11a κωδικοποιεί ένα από αυτά τα κυτοχρώματα, το P450<sub>sc</sub>, που εντοπίζεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Το ένζυμο αυτό αποτελείται από 561 αμινοξέα και μετατρέπει τη χοληστερόλη σε πρεγνενολόνη, που αποτελεί το πρώτο βήμα στη σύνθεση όλων των στεροειδών ορμονών. Εκφράζεται και σε άλλους στεροειδογόνους ιστούς που παράγουν στεροειδείς ορμόνες του φύλου, όπως όρχεις, ωοθήκες, και πλακούντα (Morohashi et al. 1984; Chung et al. 1986) (John et al. 1984).

Η χοληστερόλη μετατρέπεται σε πρεγνενολόνη, και από εκεί σε προγεστερόνη και σε ανδροστενδιόνη, και από εκεί σε τεστοστερόνη όπως φαίνεται στη Εικόνα 10.



Εικόνα 10: Η μετατροπή της χοληστερόλης σε τεστοστερόνη.

## ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΠΟΛΥΚΥΣΤΙΚΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ – ΓΟΝΙΔΙΟ CYP11a

Έχειδειχθεί ότι μια ανωμαλία της βιοσύνθεσης των ανδρογόνων από τα κύτταρα της θήκης των ασθενών με σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών επηρεάζει την ποσότητα παραγωγής του ενζύμου P450scs και οδηγεί στη υπερέκκριση των ωοθηκικών ανδρογόνων, όπως της ανδροστενεδιόνης (A) και της προγεστερόνης (P) (Gilling-Smith et al. 1994). Σε πολλές ασθενείς με το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών όπως είπαμε και παραπάνω παρατηρείται αυξημένη υπογονιμότητα και υπερανδρογοναιμία. Η αύξηση της υπερανδρογοναιμίας μπορεί να οφείλεται σε αυξημένη δράση του πρώτου ενζύμου βιοσύνθεσης ανδρογόνων – οιστραδιόλης, εφόσον θεωρήσουμε σταθερή την δραστικότητα του τελευταίου ενζύμου της αρωματάσης (Franks 1991). Το δεδομένο αυτό, υποδηλώνει περαιτέρω την υποκείμενη διαταραχή της βιοσύνθεσης των ανδρογόνων (Franks 1989). Έχειδειχθεί ότι ο υποδοχέας της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH) μπορεί να εκφράζεται πρόωρα σε κοκκιώδη κύτταρα στους ασθενείς και συντονισμένα να υπερεκφράζεται στα κύτταρα θήκης από τις πολυκυστικές ωοθήκες (Jakimiuk et al. 2001). Έτσι λοιπόν οι πολυμορφισμοί του γονιδίου CYP11a μπορεί να είναι υπεύθυνοι σε μεγάλο βαθμό για το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών.

## ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ (TTTTA)<sub>n</sub> ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ CYP11a

Στον υποκινητή του γονιδίου έχει εντοπιστεί το πεντανουκλεοτίδιο (TTTTA)<sub>n</sub> που βρίσκεται στη θέση 528 bp ανοδικά από το σημείο έναρξης της μετάφρασης του γονιδίου. Στον άνθρωπο έχουν εντοπιστεί τέσσερα, έξι, επτά, οκτώ, εννέα, δέκα και έντεκα επαναλήψεις, αν και ο πιο συχνός αριθμός των επαναλήψεων είναι το τέσσερα, το έξι, το οκτώ και το εννέα. Ελάχιστα είναι τα άτομα που έχουν τις επαναλήψεις 7, 10 και 11. Έρευνες έχουν γίνει που σχετίζουν το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών, την υπερτρίχωση και την υπερανδρογοναιμία με την απουσία του αλληλομόρφου τεσσάρων-επαναλήψεων (Gharani et al. 1997).

## 1.5 Μετα-ανάλυση

Ο ρυθμός με τον οποίο παράγεται και εμπλουτίζεται η γνώση είναι ταχύτατος. Κάθε χρόνο ερευνητές και επιστήμονες δημοσιεύουν περισσότερα από τρία εκατομμύρια άρθρα σε επιστημονικά περιοδικά, καθένα από τα οποία προσθέτει ένα μικρό ύψος στο υπάρχων βουνό των αποδεικτικών στοιχείων. Η πληθώρα των δημοσιεύσεων και η παροχή μεγάλου όγκου πληροφοριών καθιστούν δύσκολη την προσπάθεια των επιστημόνων υγείας να αξιολογήσουν ο,τι τους ενδιαφέρει και να ασκήσουν τη βασισμένη σε ενδείξεις κλινική πρακτική. Γι' αυτό το λόγο κρίνεται απαραίτητη η σύνθεση των αποτελεσμάτων που προέρχονται από την πληθώρα των μελετών που διεξάγονται και αυτό επιτυγχάνεται με την επιστημονική μέθοδο της *συστηματικής ανασκόπησης* (systematic review).

### ΟΡΙΣΜΟΣ

Η μετα-ανάλυση είναι η μέθοδος η οποία συμπεριλαμβάνει συνδυασμό πληροφοριών από σχετιζόμενες αλλά ανεξάρτητες μελέτες. Με τον συνδυασμό πολλών μελετών, μια ολοκληρωμένη ανάλυση θα έχει μεγαλύτερη στατιστική δύναμη απ' ό,τι μια ανάλυση που βασίζεται πάνω μόνο σε μια μελέτη. (Carlin 2000)

### ΙΣΤΟΡΙΑ

Η πρώτη μετα-ανάλυση πραγματοποιήθηκε από τον Karl Pearson το 1904, ενώ ο όρος «μετα-ανάλυση» χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1976 από τον ψυχολόγο Gene Glass. Αν και η μετα-ανάλυση χρησιμοποιείται ευρέως στην επιδημιολογία, η πρώτη μετα-ανάλυση της ιατρικής θεραπείας δεν δημοσιεύτηκε μέχρι το 1955. (Womack et al. 1997) Στη δεκαετία του 1970 αναπτύχθηκαν στατιστικές τεχνικές μετα-ανάλυσης και άρχισαν να δημοσιεύονται σχετικά άρθρα, ενώ από τη δεκαετία του 1980 και μετά ο αριθμός των συστηματικών ανασκοπήσεων/μετα-αναλύσεων αυξάνει με ταχύτατους ρυθμούς. Η διεξαγωγή συστηματικών ανασκοπήσεων/μετα-αναλύσεων είναι ιδιαίτερα χρήσιμη καθώς συμβάλλουν στη συνεχιζόμενη εκπαίδευση των επαγγελματιών υγείας, στη λήψη κλινικών αποφάσεων, στη διατύπωση νέων ερευνητικών υποθέσεων και στον άρτιο σχεδιασμό πρωτοκόλλων. Το κόστος είναι ελάχιστο, συγκρινόμενο με αυτό της βασικής έρευνας, ενώ η ζήτηση από το αναγνωστικό κοινό γίνεται ολοένα και μεγαλύτερη.

## ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗΣ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗΣ

Η μετα-ανάλυση μπορεί να θεωρηθεί ως μια παρατηρητική μελέτη αποδεικτικών στοιχείων. Μελέτη παρατήρησης θεωρείται μια αιτιολογική και αποτελεσματική μελέτη αποτελεσμάτων χρησιμοποιώντας δεδομένα από μια ήδη υπάρχουσα βάση δεδομένων, μια συγχρονική μελέτη ή ένα σχέδιο ελέγχου περιπτώσεων. Τα βήματα που εμπλέκονται είναι παρόμοια με αυτά κάθε άλλης έρευνας: (Womack et al. 1997),(Stroup et al. 2000)

1. Διαμόρφωση του προβλήματος που πρέπει να αντιμετωπιστεί
2. Συλλογή δεδομένων με συστηματική έρευνα
3. Ανάλυση των δεδομένων
4. Εξαγωγή και υποβολή αποτελεσμάτων

Η πραγματοποίηση της συστηματικής ανασκόπησης υλοποιείται με την αναζήτηση σε τράπεζες δεδομένων ανάλογα με θέμα που μας ενδιαφέρει. Χρησιμοποιούμε ως λέξεις-κλειδιά όρους που μελετάμε σε όλες τις εναλλακτικές μορφές για παράδειγμα gene, allele, mutant, mutation, polymorphism ή συνδυασμό αυτών των όρων. Είναι σημαντικό να επισημάνουμε ότι οι λέξεις – κλειδιά και η ημερομηνία λήξης της έρευνας πρέπει να αναφέρονται με ακρίβεια.

Η μετα-ανάλυση είναι μια συστηματική ανασκόπηση και επικεντρώνεται στη στατιστική ανάλυση της συλλογής δεδομένων, τα οποία προέρχονται από ανεξάρτητες αλλά συναφείς μελέτες με σκοπό την ενοποίηση των δεδομένων και την εξαγωγή σαφέστερων συμπερασμάτων. Πριν ωστόσο την πραγματοποίηση της μετα-ανάλυσης και την χρήση των δεδομένων για την αποφυγή σφάλματος που θα μειώσει την εγκυρότητα του συγκεντρωτικού αποτελέσματος που εξάγεται μετά από τη συστηματική βιβλιογραφική ανασκόπηση και τη μετα-ανάλυση, σημαντικός είναι ο έλεγχος για “γκρίζα βιβλιογραφία”. Πρόκειται για το σφάλμα δημοσίευσης (**publication bias**) (βλέπε σελ. 49). που αφορά αδημοσίευτες διατριβές και μελέτες. Το φαινόμενο αυτό είναι ιδιαίτερα ανησυχητικό καθώς αδημοσίευτες μελέτες μπορούν να έχουν συστηματικά διαφορετικό αποτέλεσμα σε σχέση με τις δημοσιευμένες μελέτες. Απαραίτητη προϋπόθεση για την εφαρμογή της κατάλληλης μαθηματικής μεθόδου αποτελεί ο έλεγχος της ομοιογένειας (βλέπε σελ. 40) μεταξύ των μελετών για την επιλογή του μοντέλου που θα εφαρμόσουμε. Σε περίπτωση

ομοιογένειας εφαρμόζουμε το μοντέλο των σταθερών επιδράσεων (fixed-effects model) ενώ σε περίπτωση ετερογένειας εφαρμόζουμε το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων (random-effects model) (βλέπε σελ. 37 ).

Τα άρθρα και οι περίληψεις που ανακτώνται από την αναζήτησή της βιβλιογραφίας χρειάζονται περεταίρω έλεγχο και επιλογή με σκοπό τον διαχωρισμό βάσει κριτηρίων. Τα κριτήρια αυτά πρέπει να έχουν καθοριστεί εκ' των προτέρων για τον εντοπισμό των ακριβή δεδομένων που αναζητούμε.

Για την κάθε μελέτη, που καθορίσαμε ότι πρόκειται να συμπεριληφθεί στη μετα-ανάλυση, με μαθηματικό τρόπο για ένα συνδυαστικό αποτέλεσμα, καταγράφουμε τον τίτλο της μελέτης, το όνομα του πρώτου συγγραφέας, το περιοδικό της δημοσίευσης και το έτος δημοσίευσης.

## ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ

Στόχος των μετα-αναλύσεων είναι ο εντοπισμός των γονιδίων και ενός δείκτη που να συνδέεται με την προδιάθεση με τη νόσο. Δευτερεύοντος, μπορούν να ανιχνεύσουν το γενετικό μοντέλο κληρονομικότητας της συγκεκριμένης νόσου. Οι μελέτες αυτές διενεργούνται για να καθοριστεί αν μια γενετική μετάλλαξη δηλαδή ο πολυμορφισμός ενός γονιδίου σχετίζεται με τη νόσο. Έτσι λοιπόν στην παρούσα πτυχιακή στόχος μας είναι να διερευνήσουμε αν ο πολυμορφισμός του (TAAAA)<sub>n</sub> του γονιδίου SHBG (Sex hormone Binding Globulin) και ο πολυμορφισμός του (TTTTA)<sub>n</sub> του γονιδίου CYP11a σχετίζονται με το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών. Θα προσπαθήσουμε να βρούμε πρότυπα κληρονομικότητας αυτών των πολυμορφισμών, εφόσον το επιτρέπουν τα δεδομένα μας. Θα διερευνήσουμε αν οι πολυμορφισμοί προκαλούν κίνδυνο για PCOS ή αν συγκεκριμένοι βιοχημικοί δείκτες μεσολαβούν για τον αυξημένο κίνδυνο που παρουσιάζεται στα άτομα που έχουν τον πολυμορφισμό. Για την υλοποίηση και την διεξαγωγή του αποτελέσματος χρησιμοποιήσαμε, όπως προαναφέραμε την μέθοδο της μετα-ανάλυσης για τον υπολογισμό του κινδύνου και την μέθοδο της μετά-παλινδρόμησης για τον έλεγχο των βιοχημικών δεικτών.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

## 2.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Αρχικά πραγματοποιήσαμε μια λεπτομερή αναζήτηση στη βάση δεδομένων Pubmed του NCBI (www. ncbi. nlm. nih. gov/pubmed) με λέξεις κλειδιά τις λέξεις SHBG, polymorphism και PCOS (Polycystic Ovarian Syndrome) για την αναζήτηση άρθρων και βιβλιογραφίας που σχετίζονται με τους πολυμορφισμούς των γονιδίων που θα διερευνηθούν στην παρούσα πτυχιακή και με την ασθένεια του συνδρόμου των πολυκυστικών ωοθηκών. Ύστερα από πολλά queries το τελικό query που χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση των άρθρων που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη ήταν:

***(PCOS OR “polycystic ovary syndrome” OR “polycystic ovarian syndrome” OR “polycystic ovaries”) AND (mutant OR polymorphism OR mutation OR variant OR Allele) AND (SHBG OR “sex hormone binding globulin” OR “sex hormone binding protein” OR “sex hormone binding globin” OR P450scc OR CYP11A\*)***

Συγκεντρώθηκαν 57 άρθρα, ύστερα από εκτενή μελέτη απορρίψαμε μελέτες για διαφορετικά γονίδια από το SHBG και το CYP11a όπως follistatin, μελέτες in vitro έκαναν αναφορά σε πειράματα που είχαν πραγματοποιηθεί σε ποντίκια, δεν ήταν μελέτες ασθενών-υγιών και έκαναν αναφορά σε άλλες ασθένειες και όχι στο σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών.

Ύστερα από την ολοκλήρωση της αναζήτησης της βιβλιογραφίας τον Οκτώβριο του 2010, επιλέχτηκαν τελικά 17 μελέτες που χρησιμοποιήθηκαν στην μετα-ανάλυση. Καταγράψαμε τα πιο σημαντικά δεδομένα τους στο excel. Δηλαδή συγγραφέας(AUTHOR), χρονολογία που πραγματοποιήθηκε η μελέτη (YEAR), την χώρα (COUNTRY), την φυλή (RACE) τον συνολικό αριθμό των ασθενών(CASES), τον συνολικό αριθμό των υγιών (CONTROLS) και τις διαχωρίσαμε ανάλογα με τους πολυμορφισμούς που εντοπίσαμε τον (TAAAA)n στο γονίδιο SHBG τον (TTTTA)n στο CYP11a (Πίνακας 2) . Τα δεδομένα των παραπάνω μελετών χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια από το πρόγραμμα Stata 10 για την διεξαγωγή των αποτελεσμάτων.



**Πίνακας 2: Οι μελέτες για τον πολυμορφισμό (TAAAA)<sub>n</sub> και (TTTTA)<sub>n</sub>.**

AUTHOR	YEAR	LOCATION	RACE	CASES	CONTROLS
(TAAAA) <sub>n</sub>					
Qiaorui Lui	2008	China	Asians	187	175
Polonca Ferk	2007	Slovenia	Asians	123	110
Nectaria Xita	2003	Ioannina	Caucasian	185	324
Nectaria Xita	2008	Ioannina	Caucasian	180	160
Zhao JL	2005	China	Asians	157	156
Nectaria Xita	2008	Ioannina	Caucasian	180	168
Patrice Cousin	2004	France	Others	154	149
(TTTTA) <sub>n</sub>					
Evanthia Diamanti- Kandarakis	2000	Greece	caucasians	80	90
Madhavi Pusalkar	2009	India	other	100	100
Yong Wang	2006	China	Asians	202	147
Michelle Gaasenbeek	2004	UK	caucasians	467	944
Michelle Gaasenbeek	2004	UK	caucasians	193	336
Jose´ L. San Milla´ n	2001	Spain	caucasians	34	33
Neda Gharani	1996	Australia	caucasians	97	110
Sai´d Daneshmand	2002	California	caucasians	51	280
Polonca Ferk	2004	Slovenia	caucasians	58	58

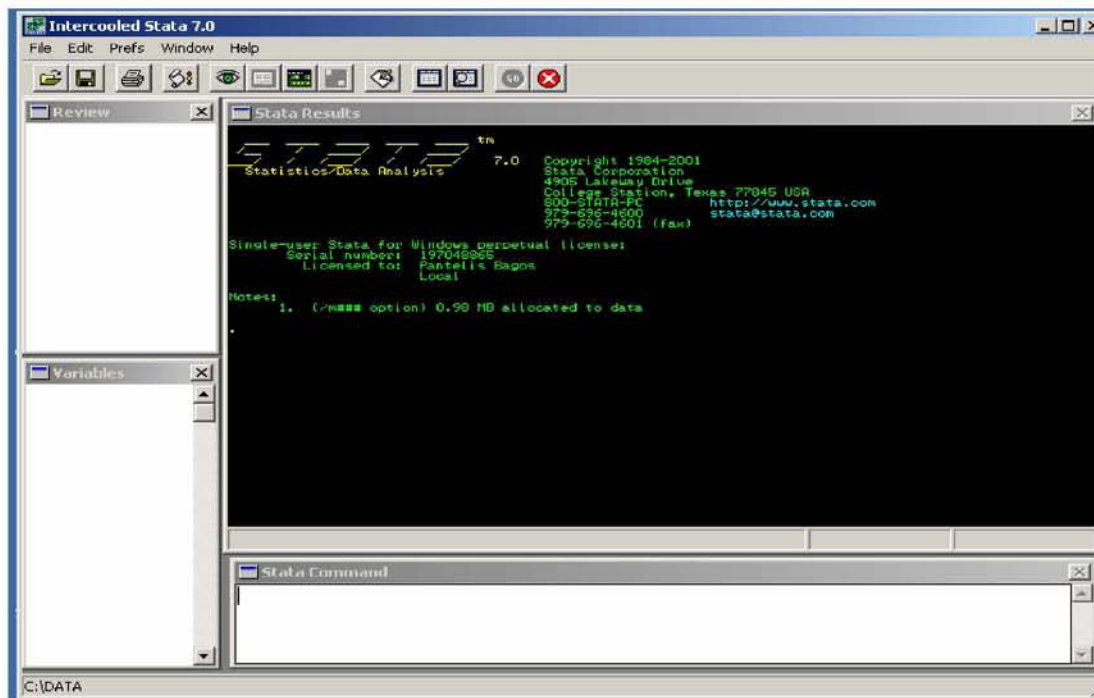
## 2.2 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΟ ΠΑΚΕΤΟ (STATA 10)

Το Stata (Εικόνα 12) είναι ένα πλήρες, ολοκληρωμένο στατιστικό πακέτο λογισμικού που δημιουργήθηκε το 1985 από StataCorp. Οι περισσότεροι από τους χρήστες του έργου στον τομέα της έρευνας, ιδίως στους τομείς της οικονομίας, την κοινωνιολογία, πολιτική επιστήμη, της βιοϊατρικής και της επιδημιολογίας . Στις δυνατότητες του πακέτου Stata συμπεριλαμβάνονται:

- ανάλυση δεδομένων
- διαχείριση δεδομένων
- στατιστική ανάλυση
- γραφικά
- προσομοιώσεις

Οι εξής λόγοι που επιλέξαμε το πακέτο Stata 10 για την μετα-ανάλυση είναι οι εξής λόγοι: (Data analysis and statistical software (stata))

1. Εύκολο προς χρήση
2. Γρήγορο
3. Ακριβές
4. Φιλικό ως προς τον χρήστη γραφικό περιβάλλον
5. Γραμμή εντολών
6. Παράθυρο εντολών για γρήγορη πρόσβαση σε προηγούμενες εντολές



**Εικόνα 12:** Η διεπαφή του στατιστικού πακέτου stata , με το κυρίως παράθυρο, κάτω δεξιά την γραμμή εντολών, κάτω αριστερά το παράθυρο που περιέχει τις μεταβλητές που υπάρχουν στην μνήμη και πάνω αριστερά οι αποθηκευμένες εντολές.

Στο παράθυρο Stata Results εμφανίζονται τα αποτελέσματα από τις εντολές που πληκτρολογούμε στο παράθυρο Stata Command. Το παράθυρο Variables αποθηκεύει τις μεταβλητές που έχουμε χρησιμοποιήσει και το παράθυρο Reviews μας δείχνει τις εντολές που έχουμε ήδη χρησιμοποιήσει. Τις εντολές αυτές μπορούμε πολύ εύκολα να τις χρησιμοποιήσουμε ξανά καθώς με ένα μόνο πάτημα από το παράθυρο Reviews, η εντολή θα εμφανιστεί στο παράθυρο Stata Command.

Κύριο εργαλείο της γραμμής εργαλείων του στατιστικού πακέτου Stata είναι το Data->Data Editor όπου αποθηκεύουμε τα δεδομένα μας με σκοπό την επιτυχή εκτέλεση των εντολών. Αφού καταχωρήσουμε τα δεδομένα μας στο Data Editor στο περιβάλλον του Stata πριν προχωρήσουμε στην διαδικασία της μετα-ανάλυσης θα πρέπει να αποφασίσουμε ποιο στατιστικό μοντέλο θα χρησιμοποιήσουμε. Παρέχει επιπλέον βοήθεια (Help->Stata Command) όπου μπορούμε να πάρουμε πληροφορία για οποιαδήποτε εντολή χρησιμοποιείται από το πακέτο και να κατεβάσουμε (download) την εντολή αυτή σε περίπτωση που δεν υπάρχει στο πακέτο.

## 2.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

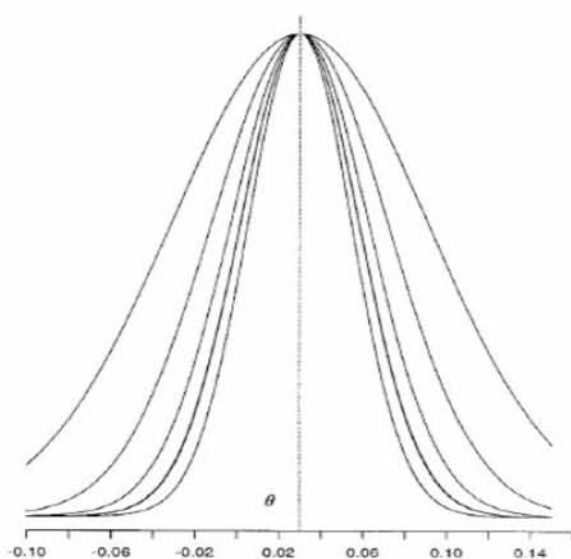
### 2.3.1 ΜΟΝΤΕΛΟ ΣΤΑΘΕΡΩΝ ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ (fixed - effect model)

Η βασική διαδικασία στη μετα-ανάλυση είναι η αντιμετώπιση  $n$  μελετών από τις οποίες υπολογίζεται μια κοινή παράμετρος ενδιαφέροντος  $\theta$  ( $i=1, \dots, n$ ). Στην περίπτωση της ομοιογένειας το στατιστικό μοντέλο που πρέπει να χρησιμοποιηθεί για τον συνδιασμό των μελετών και την διεξαγωγή του αποτελέσματος είναι το μοντέλο σταθερών επιδράσεων (fixed-effect model) (Εικόνα 13) (Delgado-Rodriguez 2001; van Houwelingen et al. 2002).

Ένα μοντέλο σταθερών επιδράσεων προϋποθέτει ότι όλα τα δείγματα,  $Y_i$ , από κάθε μελέτη προέρχονται από έναν ενιαίο πληθυσμό. Υποθέτουμε ότι κοινή παράμετρος ενδιαφέροντος είναι η  $\theta$ , ότι έχουμε 1, 2 ...  $n$  ανεξάρτητες μελέτες, ότι το  $Y_i$  τέτοιο ώστε  $E(Y_i) = \theta$  και η διακύμανση από κάθε μελέτη  $s_i^2 = \text{var}(Y_i)$ . Για μελέτες μεγάλου μεγέθους, κάθε  $Y_i$  (δείγματα κάθε μελέτης) πρέπει να ακολουθούν ασυμπτωτικά την κανονική κατανομή (Εικόνα 1). Ο τύπος που εκφράζει αυτό το μοντέλο είναι:

$$Y_i \sim N(\theta, s_i^2)$$

θεωρώντας ότι η διακύμανση,  $s_i^2$ , είναι γνωστή και ότι η κεντρική παράμετρος ενδιαφέροντος είναι το  $\theta$  (Carlin 2000). Στη συνοπτική εκτίμηση, λαμβάνεται μόνο υπόψη η διακύμανση κάθε μελέτης (Delgado-Rodriguez 2001).



Εικόνα 13: Ένα μοντέλο σταθερών επιδράσεων. Η διανομή πέντε υποθετικών μελετών όπου κάθε δείγμα,  $Y_i$ , που παρέχει τον υπολογισμό μιας κοινής παραμέτρου  $\theta$ . Η διαφορά μεταξύ των 5 μελετών στηρίζεται στο  $s_i^2$ , δηλαδή πόσο καλά το κάθε δείγμα από κάθε μελέτη υπολογίζει το  $\theta$ . (Carlin 2000).

### 2.3.2 ΜΟΝΤΕΛΟ ΤΥΧΑΙΩΝ ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ (random effect-model)

Το δημοφιλές μοντέλο για την μετα-ανάλυση στο πλαίσιο της ετερογένειας είναι το μοντέλο των τυχαίων επιδράσεων (*random effect-model*), στο οποίο η μεταβλητότητα του αποτελέσματος οφείλεται τόσο στη μεταβλητότητα που παρουσιάζει η κάθε μελέτη εξαιτίας της χρήσης διαφορετικών «δειγμάτων» πληθυσμού, όσο και στη μεταβλητότητα μεταξύ των διαφόρων μελετών. Στο μοντέλο αυτό είναι δυνατή η γενίκευση των αποτελεσμάτων.

Το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων (Εικόνα 14) προϋποθέτει ότι τα δείγματα που συμπεριλαμβάνονται στην μετα-ανάλυση προέρχονται από μια διανομή πληθυσμού με μέγεθος επίδρασης  $\theta_i$  και διακύμανση  $s_i^2$ . Ο τύπος που εκφράζει αυτό το μοντέλο είναι:

$$Y_i \sim N(\theta_i, s_i^2)$$

Σύμφωνα με τον DerSimonian and Laird (DerSimonian and Laird 1986) κάθε  $\theta_i$  από κάθε μελέτη υποτίθεται ότι προέρχεται από ανεξάρτητο τυχαίο δείγμα από ένα φυσιολογικό πληθυσμό (van Houwelingen et al. 2002) με μέση τιμή  $\theta$  και τυπική απόκλιση  $\tau^2$  με τύπο :

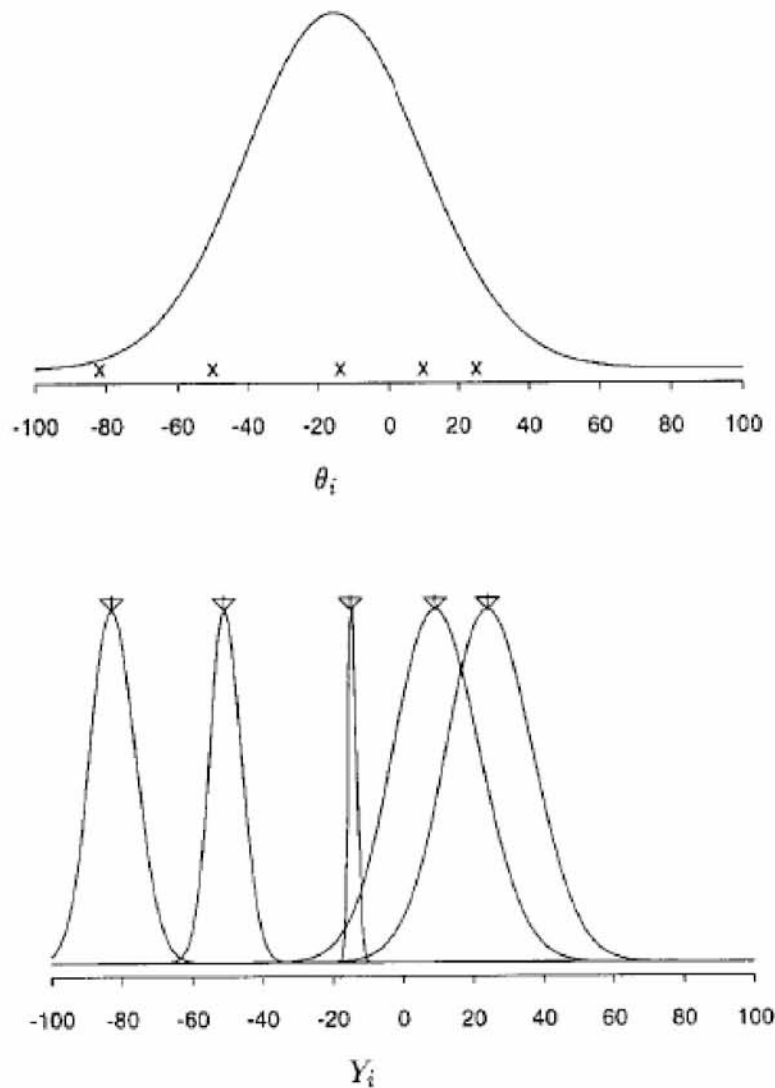
$$\theta_i \sim N(\theta, \tau^2)$$

όπου  $\theta$  και  $\tau^2$  αναφέρονται ως υπερπαραμέτροι που αντιπροσωπεύουν το κοινό μέγεθος επίδρασης και την διακύμανση αντίστοιχα. Δεδομένων των υπερπαραμέτρων, η οριακή διανομή κάθε μελέτης λαμβάνεται με μέση τιμή  $\theta$  και διακύμανση  $s_i^2 + \tau^2$ . Όπως και στο μοντέλο των σταθερών επιδράσεων το  $\theta$  είναι η κοινή παράμετρος ενδιαφέροντος, το  $\tau^2$  παίζει επίσης πολύ σημαντικό ρόλο και γι' αυτό τον λόγο πρέπει να υπολογιστεί. Η κατανομή του  $\theta_i$  με τα παρατηρούμενα δεδομένα και τις υπερπαραμέτρους, δηλώνει την posterior διανομή είναι με τύπο :

$$\theta_i \sim N(B_i \theta + (1 - B_i) Y_i, s_i^2 (1 - B_i))$$

όπου  $Y_i = (Y_1, Y_2, \dots, Y_k)$  και το  $B_i$  ορίζεται ως  $\frac{s_i^2}{s_i^2 + \tau^2}$  που αναφέρεται σαν τον παράγοντα συρρίκνωσης κάθε μελέτης. Το  $B_i$  κυμαίνεται από 0 έως και 1. Ένα

σημαντικό γεγονός που πρέπει να λάβουμε υπόψη μας είναι ότι όταν το  $\tau^2=0$  έχει σαν αποτέλεσμα την μεγιστοποίηση της συρρίκνωση με  $B_i=1$ , ώστε  $\theta_1=\theta_2=\dots=\theta_k=\theta$  με αποτέλεσμα το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων να συμπίπτει με το μοντέλο σταθερών επιδράσεων.



**Εικόνα 14: Μοντέλο τυχαίων επιδράσεων.** Η διανομή πέντε υποθετικών στατιστικών μελετών όπου κάθε μέγεθος επίδρασης  $\theta_i$  προέρχεται από έναν υπερπληθυσμό με μέγεθος επίδραση  $\theta$  και διακύμανση  $\tau^2$  (πάνω διάγραμμα). Στο παράδειγμά μας καθένα από τα πέντε μεγέθη επίδρασης παράγουν τα πέντε αποτελέσματα των μελετών. (Carlin 2000)

Στην περίπτωση του σφάλματος δημοσίευσης, η χρήση του τυχαίου μοντέλου επιδράσεων θα επιδεινώσει τα πράγματα, καθώς όλο το βάρος θα δοθεί στις μικρότερες μελέτες. (Shi and Copas 2004)

Μερικές φορές ωστόσο είναι καλύτερο να χρησιμοποιούμε μια προσέγγιση που να αποφεύγει τον υπολογισμό του standard error, υπολογίζοντας την μέγιστη πιθανότητα ή με την χρήση του διαστήματος εμπιστοσύνης. Με προσέγγιση 95% η πιθανότητα βρίσκεται στο διάστημα (van Houwelingen et al. 2002)

$$(\theta-1,96\sigma, \theta+1,96\sigma)$$

Στην περίπτωση της παρούσας μετα-ανάλυσης επιλέγουμε το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων καθώς τα δεδομένα μας προέρχονται από διαφορετικούς και όχι από έναν ενιαίο πληθυσμό.

## 2.4 ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΤΕΡΟΓΕΝΕΙΑΣ

Για να ελέγξουμε την ετερογένεια των μελετών πραγματοποιούμε μια δημοφιλής στατιστική ανάλυση, γνωστή ως Q Cochran. Το Q Cochran είναι το άθροισμα των τετραγώνων των διαφορών μεταξύ της εκτίμησής του αποτελέσματος κάθε μελέτης και της συνολικής εκτίμηση του αποτελέσματος, σταθμισμένη για τις πληροφορίες που παρέχονται από την συγκεκριμένη μελέτη. (Egger et al. 1997) Ο τύπο που εκφράζει το Q Cochran είναι (DerSimonian and Laird 1986; Villanueva and Zavarsek 2004) :

$$Q = \sum w_i (y_i - y_w)^2$$

$y_i$  είναι η εκτίμηση του αποτελέσματος για την κάθε μελέτη,

$$y_w = \frac{\sum w_i y_i}{\sum w_i}$$

είναι η συνολική εκτίμηση του αποτελέσματος και

$$w_i = 1/s^2$$

είναι το αντίστροφο της διακύμανσης,  $s^2$  για  $i=1, \dots, n$

Η στατιστική Q όμως είναι χρήσιμη μόνο για τον έλεγχο της ύπαρξης της ετερογένειας, αλλά όχι για τον υπολογισμό της έκτασης της ετερογένειας.

Ο Higgins και οι συνεργάτες του πρότειναν δύο μέτρα για να ποσοτικοποιήσουν τις επιπτώσεις της ετερογένειας στη μετα-ανάλυση. Το πρώτο μέτρο είναι το  $H^2$  που είναι ο λόγος του  $Q$  προς τους βαθούς ελευθερίας μείον ένα ή τον αριθμό των μελετών μείον μία ( $k-1$ ), που εκφράζεται από τον παρακάτω τύπο:

$$H^2 = \frac{Q}{k-1}$$

Το δεύτερο μέτρο είναι το  $I^2$  που περιγράφει το ποσοστό της ετερογένειας μεταξύ των μελετών σε σχέση με τη συνολική μεταβλητότητα ( $\tau^2$ ) μεταξύ των εκτιμήσεων των αποτελεσμάτων. Το  $\tau^2$  και το  $I^2$  εκφράζονται από τους παρακάτω τύπους αντίστοιχα:

$$\tau^2 = \frac{Q - (k-1)}{\sum w_i - \frac{\sum w_i^2}{\sum w_i}} \quad I^2 = \frac{\tau^2}{\tau^2 + S^2}$$

Το  $I^2$  παίρνει τιμές από 0-100%. Όταν το  $I^2$  είναι μικρότερο από 25% υπάρχει πολύ μικρή ή καθόλου ετερογένεια. Ενώ ένα  $I^2 > 50\%$  δηλώνει ότι υπάρχει μεγάλη ετερογένεια στις μελέτες για τις οποίες θα πραγματοποιήσουμε μετα-ανάλυση. Τα δύο παραπάνω μέτρα συνδέονται με τον παρακάτω τύπο:

$$I^2 = \frac{H^2 - 1}{H^2}$$

Ενώ συνδέοντας το  $I^2$  με το  $Q$  έχουμε τον εξής τύπο:

(Huedo-Medina et al. 2006)

$$I^2 = \frac{Q - k + 1}{Q} * 100\%$$



Ένα ενδεικτικό παράδειγμα (Πίνακας 3) για τους δείκτες ετερογένειας, το Cochran's Q, το P-value της ετερογένειας, το  $I^2$ ,  $\tau^2$  επεξηγείται παρακάτω.

Race	Cochran's Q	P-value for heterogeneity	I squared	Between studies variance
All	8. 02	0. 091	50. 1%	0. 0251
Caucasian	0. 51	0. 474	0. 0%	0. 0000
Asian	0. 13	0. 937	0. 0%	0. 0000

**Πίνακας 3: Οι δείκτες ετερογένειας για το Cochran's Q, το P-value της ετερογένειας, το  $I^2$  και το  $\tau^2$**

Ένα πολύ μικρό p-value (συγκεκριμένα μικρότερο από το 0.05) μας υποδεικνύει ότι υπάρχει ετερογένεια μεταξύ των μελετών. Η ετερογένεια αυτή μπορεί να οφείλεται σε διάφορους λόγους, όπως για παράδειγμα στα χαρακτηριστικά του πληθυσμού, στις μεταβολές στο σχεδιασμό της μελέτης ή στη διαφορά των στατιστικών μεθόδων. Αν υπάρχει ετερογένεια, το μέγεθος της επίδρασης που προκύπτει από το συνδυασμό των μελετών δεν έχει κανένα νόημα, καθώς σημαίνει ότι μπορεί να υπάρχουν περισσότερα από ένα μεγέθοι επίδρασης (Delgado-Rodriguez 2001). Σύμφωνα, λοιπόν, με τα παραπάνω στο παράδειγμά δεν παρουσιάζεται ετερογένεια, και η εκτίμηση του μεγέθους επίδρασης είναι σημαντική για την μετα-ανάλυσή μας.

## 2.5 ΜΕΓΕΘΟΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ (Effect Size)

Effect size: μια τυποποιημένη εκτίμηση του μεγέθους επίδρασης της σχέσης μεταξύ μιας έκθεσης και του αποτελέσματος. Σε γενικές γραμμές, ο όρος αυτός μπορεί εφαρμοστεί σε οποιαδήποτε μέτρηση της διαφοράς στο αποτέλεσμα μεταξύ των ομάδων που μελετούνται. (Delgado-Rodriguez 2001)

Θεωρώντας ότι πραγματοποιούμε μετα-ανάλυση k μελετών που αποτελούνται από τους ασθενείς  $n_t$  και από τους υγιείς  $n_c$ , η αναλογία των ασθενών που εμφανίζουν κάποια συμπτώματα από την κάθε ομάδα  $r_t$  και  $r_c$  αντίστοιχα και υποθέτοντας ότι οι αριθμοί των ασθενών σε κάθε μία από ομάδες μελέτης είναι ανεξάρτητες διωνυμικές τυχαίες μεταβλητές μαζί με σχετικές πιθανότητες  $p_{Ti}$  και  $p_{Ci}$ , έχουμε τρία μέτρα για τον υπολογισμό του μεγέθους επίδρασης:

1. Διαφορά κινδύνου (risk difference) που μπορεί να ορισθεί ως την διαφορά μεταξύ των δύο πιθανοτήτων  $p_{Ti} - p_{ci}$
2. Σχετικός κίνδυνος (relative risk) που μπορεί να ορισθεί ως ο λόγος μεταξύ των δύο πιθανοτήτων  $p_{Ti} / p_{ci}$  και
3. Odds ratio που μπορεί να ορισθεί ως ο λόγος της πιθανότητας των ασθενών προς την πιθανότητα των υγείων  $p_{Ti} / (1 - p_{Ti}) / p_{ci} / (1 - p_{ci})$  (DerSimonian and Laird 1986)

Όταν το effect size εφαρμόζεται σε μετρήσεις συνεχών μεταβλητών (όπως μέσος όρος), η πιο συχνή εκτιμήτρια είναι η τυποποιημένη μέση διαφορά, η οποία υπολογίζεται ως η διαφορά των μέσων που διαιρείται με τη μεταβλητότητα των μέτρων (η τυπική απόκλιση). Η πιο συχνή εκτιμήτρια που χρησιμοποιείται για την πραγματοποίηση μετα-ανάλυσης διακριτών τιμών για αναδρομικές μελέτες (όπου μελετάται η πιθανότητα έκθεσης της ασθένειας δεδομένου της κατάστασης της ασθένειας) είναι το odds ratio.

## ODDS RATIO

Αν και παρουσιάζει μερικές φορές προβλήματα στην διερμηνεία, αποτελεί την δημοφιλέστερη επιλογή για τον υπολογισμό της εκτίμησης του μεγέθους επίδρασης (effect size). Το odds είναι ένας τρόπος να παρουσιάσει την πιθανότητα ένα γεγονός να συμβεί προς την πιθανότητα να μην συμβεί. Είναι η αναλογία της πιθανότητας το γεγονός να συμβεί ( $p$ =πιθανότητα επιτυχίας) προς την πιθανότητας το γεγονός να μην συμβεί ( $1-p$ = πιθανότητα αποτυχίας).

$$\frac{p}{1-p}$$

Επιλέγουμε το odds ratio για τρεις λόγους:

- Παρέχει τον υπολογισμό (διάστημα εμπιστοσύνης) για την σχέση μεταξύ δύο δυαδικών μεταβλητών
- Μας επιτρέπει να εξετάσουμε τα αποτελέσματα άλλων μεταβλητών με βάση αυτή την σχέση
- Έχει μια ειδική και μια κατανοητή ερμηνεία για τις μελέτες ασθενείς-υγείς (case-controls)

Για την αξιολόγηση της συσχέτισης γονιδίων-ασθενειών, οι επιστήμονες συλλέγουν πληροφορίες σχετικά με τον κίνδυνο της νόσου σε συνδυασμό διαφορετικών γονοτύπων. Υπάρχουν τουλάχιστον τρεις πιθανοί γονότυποι (δύο ομόζυγοι και ένας ετερόζυγος). Οι συγκρίσεις μεταξύ των γονοτύπων συχνά ελαττώνονται σε ένα συγκεκριμένο γενετικό μοντέλο επικρατές και υπολειπόμενο. (Minelli et al. 2005)

Στην παρούσα εργασία για το γονίδιο SHBG υπάρχουν δύο αλληλόμορφα (S και L), το ένα από τα οποία θεωρείται ότι συνδέεται με την ασθένεια (L). Έχουμε τρεις γονότυπους SS, SL, LL (Πίνακας 4). Για την διευκόλυνση του υπολογισμού του odds ratio ελαττώνουμε τις τρεις ομάδες γονοτύπων σε δύο αγνοώντας τους ετεροζυγώτες. Ελέγχουμε έτσι τον κίνδυνο για PCOS πραγματοποιώντας δύο συγκρίσεις, θεωρώντας τα παρακάτω μοντέλα (Πίνακας 5, Πίνακας 6):

1. το επικρατές μοντέλο συγκρίνοντας το SL+LL με SS και
2. το υπολειπόμενο μοντέλο συγκρίνοντας το LL με SS+SL

**Πίνακας 4: Ο αρχικός πίνακας των γονοτύπων**

	Γονότυποι		
	LL	SL	SS
Ασθενείς	a	b	c
Υγιείς	d	e	f

**Πίνακας 5: Για το υπολειπόμενο μοντέλο**

	Γονότυποι	
	LL	SS+SL
Ασθενείς	a	back
Υγιείς	d	elf

Το odds ratio που προκύπτει από τον παραπάνω πίνακα είναι :

$$OR = \frac{a * (e + f)}{d * (b + c)}$$

**Πίνακας 6:** Για επικρατές μοντέλο

	Γονότυποι	
	LL+SL	SS
Ασθενείς	a+b	c
Υγιείς	d+e	f

$$OR = \frac{f * (a + b)}{c * (d + e)}$$

Με τον υπολογισμό του log odds ratio μπορούμε να υπολογίσουμε εύκολα το standard error SE(logOR) από την ρίζα του αθροίσματος των τεσσάρων αντίστροφων πιθανοτήτων από έναν πίνακα 2X2, για παράδειγμα για το τελευταίο πίνακα το  $SE_{\log(OR)}$  είναι το παρακάτω :

$$SE_{\log(OR)} = \sqrt{\frac{1}{a+b} + \frac{1}{f} + \frac{1}{d+e} + \frac{1}{c}}$$

Και το διάστημα εμπιστοσύνης δίνεται αντίστοιχα από τον τύπο: (Bland and Altman 2000)

$$CI = \log OR \pm 1.96 * SE_{\log OR}$$

Τα γραφήματα των odds ratio συχνά απεικονίζονται με τη χρήση λογαριθμικής κλίμακας λόγω της ασυμμετρίας στην κλίμακα των πιθανοτήτων. Η αναλογία πιθανοτήτων (odds ratio) είναι 1 όταν υπάρχει ισορροπία. Δηλαδή η πιθανότητα να αποκτήσουν την ασθένεια τα άτομα που έχουν τον πολυμορφισμό είναι ίση με την πιθανότητα να την αποκτήσουν αν δεν τον έχουν. Ένα odds ratio μεγαλύτερο που 1 υποδηλώνει ότι η ομάδα των ατόμων που έχουν τον παράγοντα

κινδύνου είναι περισσότερο πιθανό να αποκτήσουν την ασθένεια σε σχέση με τα άτομα τα οποία δεν έχουν, ενώ αντίστοιχα μικρότερο του ένα υποδηλώνει ότι το περιστατικό (ασθένεια) είναι περισσότερο πιθανό να εκδηλωθεί στα άτομα τα οποία δεν έχουν τον παράγοντα κινδύνου.

Ο υπολογισμός του odds ratio και του standard error στο στατιστικό πακέτο stata πραγματοποιείται με τις εξής εντολές:

**generate logOR=log((l1\*s0)/(s1\*l0)) όπου**

l1 οι ασθενείς που είχαν το αλληλόμορφο l  
l0 οι υγιείς που είχαν το αλληλόμορφο l  
s1 οι ασθενείς που είχαν το αλληλόμορφο s  
s0 οι υγιείς που είχαν το αλληλόμορφο s

Η εντολή generate δημιουργεί την καινούργια μεταβλητή logOR όπου αντιπροσωπεύει το odds ratio σε λογαριθμική κλίμακα.

Εάν όμως μία από τις δύο πιθανότητες στον πίνακα είναι 0 το logOR δεν μπορεί να υπολογιστεί. Το πρόβλημα αυτό διορθώνεται προσθέτοντας σε όλες τις συχνότητες στον υπολογισμό του log(odds ratio) τον αριθμό 0.5

**replace logOR=log(((0. 5+l1)\*(0. 5+s0))/((0. 5+s1)\*(0. 5+l0)))**  
**if l1==0|s0==0|s1==0|l0==0**

Στην συνέχεια υπολογίζουμε το standard error :

**generate stdor=sqrt(1/s1+1/l1+1/s0+1/l0)**

και αντίστοιχα για τους ίδιους λόγους προσθέτουμε το 0.5 σε όλες τις πιθανότητες στον υπολογισμό του standard error.

**replace stdor=sqrt(1/(s1+0. 5)+1/(l1+0. 5)+1/(s0+0. 5)+1/(l0+0. 5))**  
**if l1==0|l1==0|s0==0|l0==0**

## 2.6 ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Η μετα-ανάλυση στο στατιστικό πακέτο Stata πραγματοποιείται με την εντολή

```
metan l1 l0 s1 s0 , or random sortby(year) label(namevar=author,yearvar=year)  
xlab(0. 1,1,3)
```

ή

```
metan logOR stdor, eform random by(race) label(namevar=author,yearvar=year)  
xlab(0. 1,1,3)
```

όπου:

**random:** δηλώνει ότι θα χρησιμοποιήσουμε το μοντέλο των τυχαίων επιδράσεων

**sortby(year):** ταξινομεί τις μελέτες με βάση την χρονιά που δημοσιεύτηκαν με κατά αύξοντα αριθμό.

**label (namevar=author, yearvar=date):** βάζει ετικέτες στο διάγραμμα του forest plot, όπου κάθε μελέτη θα αντιπροσωπεύεται από το όνομα του συγγραφέα και τη χρονιά κατά την χρονιά που δημοσιεύτηκε η έρευνα.

**xlab (0. 1,1,3):** ορίζει τις τιμές που εμφανίζονται στον άξονα x'x του forest plot.

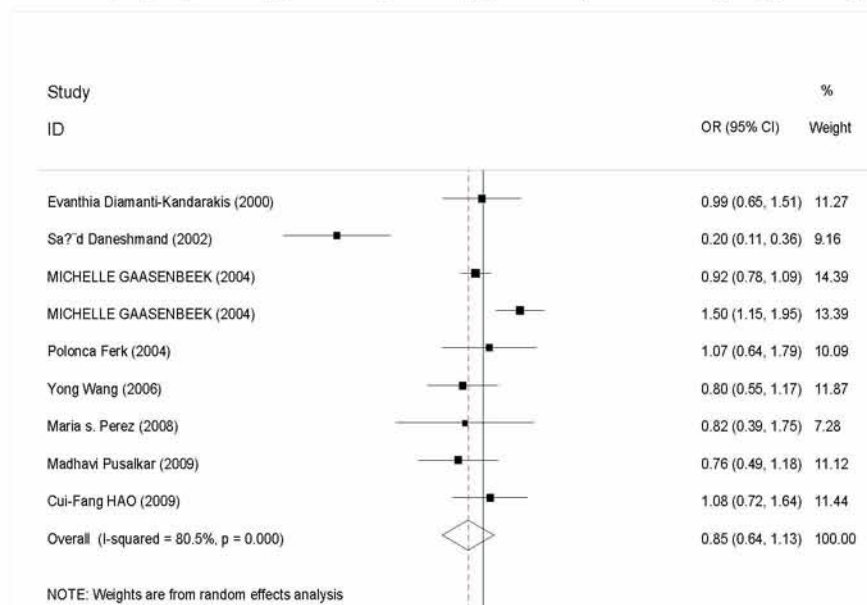
**by (race):** διαχωρίζει τις μελέτες και πραγματοποιεί ξεχωριστές επιμέρους μετά-αναλύσεις ανάλογα με την καταγωγή των ατόμων.

**eform:** χρησιμοποιείται για να αλλάξει πίσω στην αρχική κλίμακα την μεταβλητή του odds ratio καθώς για τον αρχικό υπολογισμό του χρησιμοποιούμε την λογαριθμική κλίμακα.

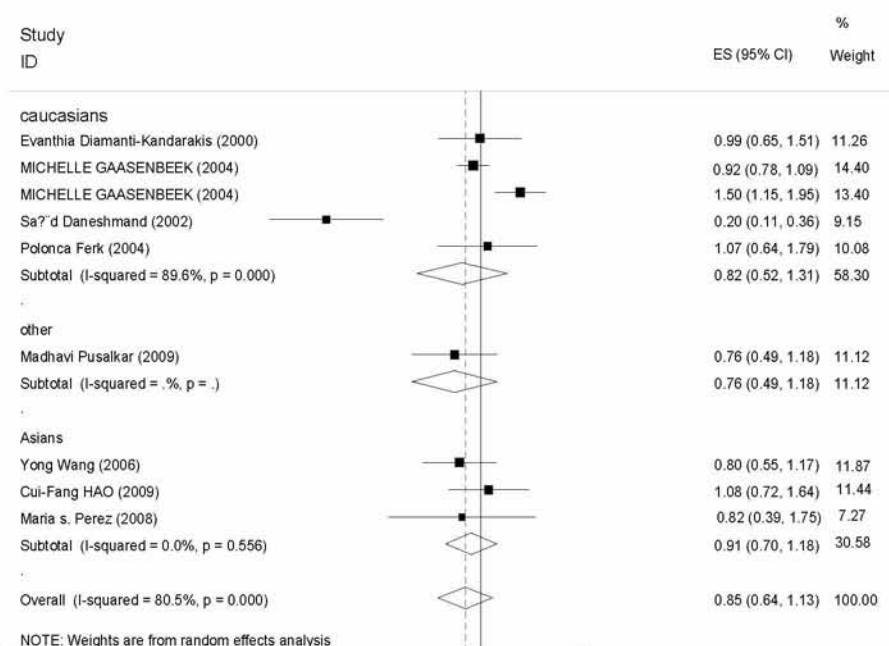
Τα παρακάτω forest plot (Εικόνα 15, Εικόνα 16) αποτελούν ενδεικτικά παραδείγματα των γραφικών παραστάσεων που προκύπτουν από την εκτέλεση των εντολών της μετά-ανάλυσης (metan). Αποτελούν παραδείγματα για τα αλληλόμορφα του

γονιδίου CYP11a. Και τα δύο διαγράμματα εμφανίζουν το ίδιο αποτέλεσμα στο τέλος με μοναδική διαφορά ότι στο δεύτερο διάγραμμα διαχωρίζουμε τις μελέτες ανάλογα με την φυλή στην οποία ανήκουν. Όπως παρατηρούμε, το αποτέλεσμα που προκύπτει δεν είναι στατιστικά σημαντικό καθώς το συνολικό odds ratio(0.85) με διάστημα εμπιστοσύνης που περιέχει το 1, (0.64 1.13).

Η κατακόρυφη γραμμή δηλώνει ότι  $OR (\log(\text{odds ratio}))=1$  ενώ η διακεκομμένη δηλώνει το OR που προέκυψε από την μελέτη που πραγματοποιήθηκε. Κάθε μελέτη διακρίνεται στο διάγραμμα από μια γραμμή κάθετη στη γραμμή του OR και διαχωρίζεται από τις υπόλοιπες από το όνομα του συγγραφέα και την χρονολογία (αριστερά του διαγράμματος) και από το OR, το διάστημα εμπιστοσύνης και το βάρος που έχει κάθε μελέτη (στα δεξιά του διαγράμματος)



Εικόνα 15: Το forest plot που παράγεται από την εντολή της μετά-ανάλυσης. Στα αριστερά παρουσιάζεται το όνομα του συγγραφέα της κάθε μελέτης μαζί με την χρονολογία ενώ στα δεξιά παρουσιάζεται το OR που είναι το odds ratio, τα διαστήματα εμπιστοσύνης και το βάρος της κάθε μελέτης.



Εικόνα 16: Δεξιά παρουσιάζονται οι μελέτες χωρισμένες σε Καυκάσιους και Ασιάτες και άλλους με το όνομα του συγγραφέα και την χρονολογία της μελέτης, ενώ αριστερά το odds ratio, το διάστημα εμπιστοσύνης και το βάρος της κάθε μελέτης.

## 2.7 ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟΤΗΤΑΣ

Με τον τρόπο που περιγράψαμε μέχρι τώρα μπορούμε να υπολογίσουμε και να ελέγξουμε τον κίνδυνο για τα διάφορα μοντέλα, τόσο για το υπολειπόμενο, για το επικρατές και για τα αλληλόμορφα. Ωστόσο όμως δεν μας επιτρέπει να ξεχωρίσουμε ποιος είναι ο τρόπος κληρονομικότητας για το γονίδιο. Σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιούμε μια διαφορετική μέθοδο, την λεγόμενη πολυμεταβλητή ανάλυση. Με την ανάλυση αυτή υπολογίζοντας τα  $b_1$  και τα  $b_2$ , που περιγράφουμε παρακάτω μπορούμε να έχουμε κάποια αποτελέσματα για το γενετικό μοντέλο κληρονομικότητας. Τα βήματα που ακολουθούμε είναι τα εξής:

Όπως ήδη αναφέραμε η σύγκριση

1. SL+LL με SS είναι για το επικρατές μοντέλο και
2. LL με SS+SL είναι για το υπολειπόμενο μοντέλο

Μια διαφορετική προσέγγιση που χρησιμοποιούμε είναι οι συγκρίσεις

1. SL με SS για το επικρατές μοντέλο

$$b_1 = y_{1i} = \log\left(\frac{SL1 * SS0}{SL0 * SS1}\right) \text{ και}$$

2. LL με SS για το υπολειπόμενο μοντέλο

$$b_2 = y_{2i} = \log\left(\frac{LL1 * SS0}{LL0 * SS1}\right)$$

Όπως ήδη έχουμε περιγράψει το standard error δίνεται από τον τύπο

Για το επικρατές μοντέλο: όπου το 1 συμβολίζει τους ασθενείς που έχουν τον αντίστοιχο γονότυπο και 0 τους αντίστοιχους υγιείς

$$SE_{\log(OR)} = \sqrt{\frac{1}{sl1} + \frac{1}{sl0} + \frac{1}{ss1} + \frac{1}{ss0}}$$



Για το υπολειπόμενο μοντέλο

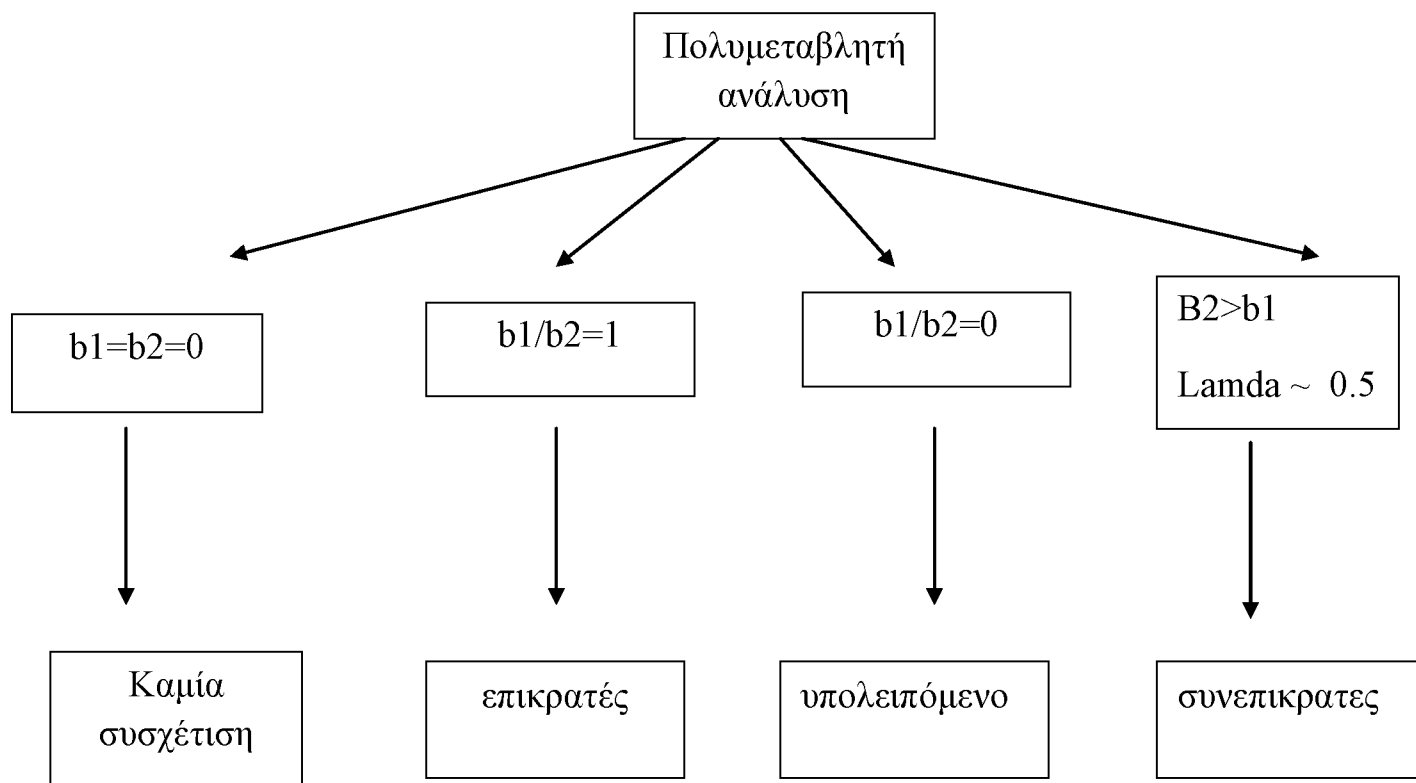
$$SE_{\log(OR)} = \sqrt{\frac{1}{ll1} + \frac{1}{ll0} + \frac{1}{ss1} + \frac{1}{ss0}}$$

Στη γενετική συσχέτιση μελετών όμως τα δύο logOR σχετίζονται μεταξύ τους καθώς και για τα δύο πραγματοποιείται μια σύγκριση με το ίδιο αντικείμενο (στην περίπτωση μας με τον ομόζυγο γονότυπο SS). Η συνδιακύμανση που υπολογίζει την συσχέτιση μεταξύ των δύο αυτών logOR δίνεται από τον τύπο:

$$\text{Cov}(y_{1i}, y_{2i}) = 1/SS0 + 1/SS1$$

όπου το 1 συμβολίζει τους ασθενείς που έχουν τον γονότυπο SS και 0 τους υγιείς που έχουν τον γονότυπο SS.

Έτσι το αποτέλεσμα από τον συνδιασμό των  $b_1$ ,  $b_2$  ή του λάμδα ( $\lambda$ ) που είναι ο λόγος  $b_1/b_2$  παρέχεται η πληροφορία που χρειαζόμαστε για το γενετικό μοντέλο κληρονομικότητας. Αν ο λόγος των δύο μεταβλητών ή το λάμδα είναι ίσο με ένα τότε προτείνετε επικρατές μοντέλο κληρονομικότητας, ενώ αν  $b_2 > b_1$  το συνεπικρατής μοντέλο είναι πιο πιθανό. Στην περίπτωση που  $b_1 = 0$  και  $b_2 > 0$  τότε η μόνη επιλογή είναι το υπολειπόμενο μοντέλο. Στο διάγραμμα 1 παρακάτω θα περιγράψουμε αναλυτικά τα βήματα για το πιθανό γενετικό μοντέλο κληρονομικότητας (Bagos and Nikolopoulos 2007; Bagos 2008).



**Διάγραμμα 1: Προσέγγιση γενετικού μοντέλου κληρονομικότητας**

## 2.8 ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

Ένα πρόβλημα που αντιμετωπίζουν συνήθως οι ερευνητές που πραγματοποιούν μια μετά-ανάλυση είναι η εκτίμηση του σφάλματος δημοσίευσης. Ο Sterling ήταν ο πρώτος που τόνισε ότι η τάση να δημοσιεύουν τα θετικά αποτελέσματα και να απορρίπτουν τα αρνητικά ευρήματα αποτελεί ένα σοβαρό πρόβλημα. Ο όρος «δημοσίευση» θεωρείται ότι περικλείει την όλη διαδικασία δημοσίευσης, συμπεριλαμβανόμενης τόσο της προετοιμασίας για την διαδικασία εντοπισμού όσο και την διαδικασία επιλογής των μελετών, της υποβολής και της δημοσίευσης. (Awad)

- Πολλοί συγγραφείς δεν υποβάλλουν μελέτες με αρνητικά αποτελέσματα, διότι υπάρχει η πιθανότητα απόρριψης. (Egger and Smith 1998)
- Μελέτες με σημαντικά αποτελέσματα είναι πιο πιθανό να δημοσιεύονται από τις μελέτες χωρίς στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα ή ακόμη και αν δημοσιεύονται παρουσιάζεται η τάση να μην παρουσιάζουν αρκετές λεπτομέρειες καθώς χαρακτηρίζεται ως «μη ενδιαφέρον» αποτέλεσμα. (Carlin 2000)

Υπάρχουν και άλλα είδη σφαλμάτων που μπορούν να εντοπιστούν κατά την διάρκεια μιας συστηματικής ανασκόπησης:

- Για την ανάπτυξη περισσότερων ευρημάτων από τις ιατρικές βάσεις δεδομένων και για την αποφυγή συστηματικών σφαλμάτων, οι συγγραφείς αναλαμβάνουν συχνά αναζητήσεις «γκρίζας βιβλιογραφίας». Γκριζα βιβλιογραφία είναι βιβλιογραφία που δεν έχει επισήμως δημοσιευτεί και μπορεί να περιλαμβάνει οποιοδήποτε υλικό από αφηρημένες αναφορές μέχρι και αδημοσίευτα στοιχεία και έρευνες. (Martin et al. 2005). Η συλλογή ωστόσο δεδομένων που συμπεριλαμβάνονται σε αδημοσίευτες μελέτες είναι ένα θέμα αμφιλεγόμενο καθώς μπορεί να τα ίδια αυτά δεδομένα να εισάγουν σφάλμα. (Davey Smith and Egger 1998)
- Στις λιγότερο ανεπτυγμένες χώρες, μελέτες με στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα είναι πιο πιθανό να δημοσιεύονται σε ένα περιοδικό που ανήκει

σε μια διεθνή βιβλιογραφική βάση δεδομένων η οποία όμως δεν αναπροσαρμόζεται σε διεθνείς βάσεις δεδομένων (*ξενόγλωσση βιβλιογραφία*). Η απόφαση για δημοσίευση μπορεί να επηρεάζεται από τη φύση του αποτελέσματος. Σημαντικά αποτελέσματα μπορεί να δημοσιεύονται σε διεθνή περιοδικά, ενώ μη σημαντικά αποτελέσματα δημοσιεύονται σε τοπικά περιοδικά, με αποτέλεσμα την δημιουργία του σφάλματος της βιβλιογραφίας (*πύργος της Βαβέλ*). Μερικές ωστόσο χώρες δημοσιεύουν ασυνήθιστα υψηλά ποσοστά μελετών με θετικά αποτελέσματα το οποίο ονομάζεται ανεστραμμένος πύργος της Βαβέλ. (Gregoire et al. 1995; Pan et al. 2005)

- Όταν ο χρόνος για την ολοκλήρωση και δημοσίευση μιας μελέτης εξαρτάται από τα πορίσματά της τότε έχουμε ως αποτέλεσμα την δημιουργία του time-lag bias. Η ταχεία παραγωγή και η διάδοση επιστημονικών πληροφοριών, οδηγεί σε αύξηση του αριθμού των μελετών με πολύ αντιφατικά συμπεράσματα σε σύντομο χρονικό διάστημα. Τα αντιφατικά αποτελέσματα είναι πιο ελκυστικά για τους ερευνητές και για τους συντάκτες, με αποτέλεσμα να δημοσιεύονται πιο γρήγορα. Η ταχεία και η έγκαιρη διαδοχή ακραίων ευρημάτων αποκαλείται φαινόμενο του Πρωτέα (*φαινόμενο Proteus*). Κατά την μυθολογία, ο Πρωτέας ήταν θεός ο οποίος μεταμορφωνόταν ο ίδιος γρήγορα σε πολύ διαφορετικά στοιχεία. Με αυτό τον τρόπο τα αποτελέσματα μιας μετα-ανάλυσης που προκύπτουν μπορεί να είναι πολύ διαφορετικά από αυτά της πρώτης μελέτης, λόγω των επιπρόσθετων μελετών που πραγματοποιήθηκαν. Η πρώτη μελέτη δείχνει συχνά μια ισχυρότερη γενετική επίδραση. Το bias και η ποικιλομορφία του πληθυσμού μπορεί να εξηγήσει γιατί οι πρώτες μελέτες τείνουν να υπερεκτιμούν την προστασία από την ασθένεια ή την προδιάθεση που παρέχει κάποιος γενετικός πολυμορφισμός (Ioannidis et al. 2001). Μπορεί ίσως τα «θετικά» αποτελέσματα στις πρώτες μελέτες να έχουν ισχυρό κίνητρο για την πιθανή συσχέτιση με κάποια ασθένεια αλλά η στατιστική σημαντικότητα και το μέγεθος της επίδρασης των πρώτων μελετών δεν μπορούν να προβλέψουν επαρκώς μια πιθανή συσχέτιση (Trikalinos et al. 2004) (Egger et al. 1997; Ioannidis and Trikalinos 2005)

Ο έλεγχος του Egger δίνει καλύτερα αποτελέσματα από τον έλεγχο του Begg όταν δεν υπάρχει σφάλμα και όταν ο αριθμός των μελετών είναι μικρός. Ωστόσο όμως το

test του Begg μπορεί να ανιχνεύσει bias για τα οποία το test του Egger είναι ευαίσθητο.

Η χρήση των funnel plots παρέχει έναν χρήσιμο έλεγχο για την πιθανή παρουσία του publication bias (Egger et al. 1997). Η γραφική αυτή μέθοδος (funnel plot) πρέπει ωστόσο να χρησιμοποιείται κατάλληλα από τους ερευνητές καθώς η λανθασμένη ερμηνεία τους μπορεί να οδηγήσει σε σφάλμα δημοσίευσης εκεί που δεν υπάρχει. Ένα συμμετρικό funnel plot δεν πρέπει να ερμηνεύεται ως η απουσία σφάλματος και η ασυμμετρία δεν σημαίνει απαραίτητα την παρουσία σφάλματος δημοσίευσης, καθώς η ετερογένεια μπορεί να προκαλέσει ασυμμετρία χωρίς την ύπαρξη κανενός είδους σφάλματος (Ioannidis and Trikalinos 2007).

## ΕΛΕΓΧΟΣ BIAS

Για να αποφύγουμε τα προβλήματα αυτά της βιβλιογραφίας εκτελούμε τις παρακάτω εντολές :

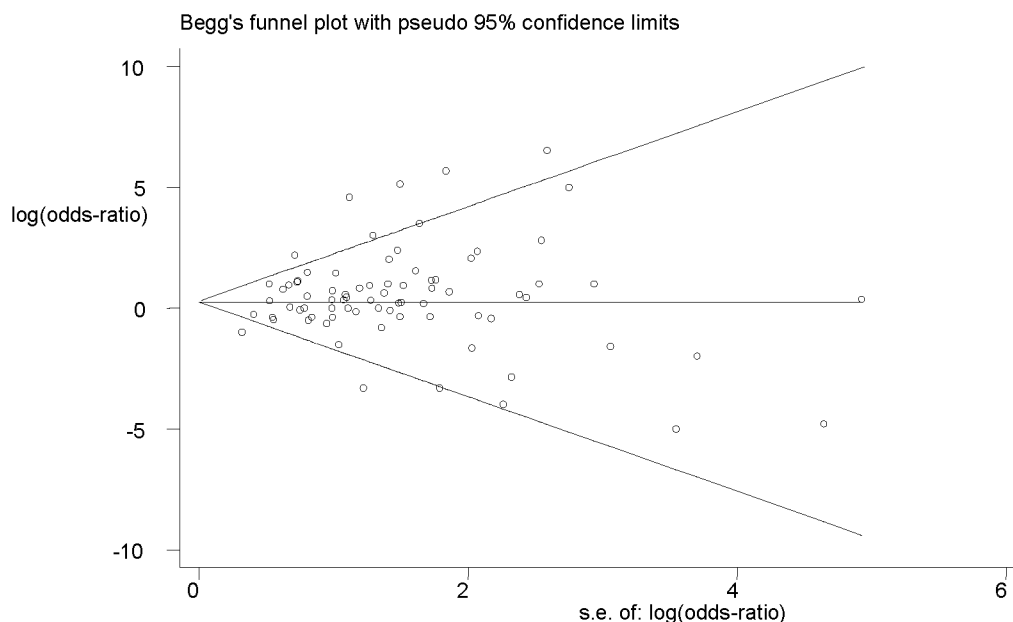
- `metabias oral stdor, gr(b)`
- `metabias oral stdor, gr(e)`
- `metareg oral stdor, level(95) wsse(stdor)`

Με τις παραμέτρους `gr(b)` και `gr(e)` παράγονται τα διαγράμματα του Begg και του Egger αντίστοιχα. Τέλος ένας επιπλέον τρόπος για να ελέγχουμε το bias είναι με την μέθοδο της μετά-παλινδρόνησης με την εντολή `metareg`. Παρακάτω παρουσιάζονται ενδεικτικά παραδείγματα των διαγραμμάτων του Begg, του Egger (Εικόνα 17, Εικόνα 18) και τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την εκτέλεση της εντολής `metareg` (Πίνακας 8).

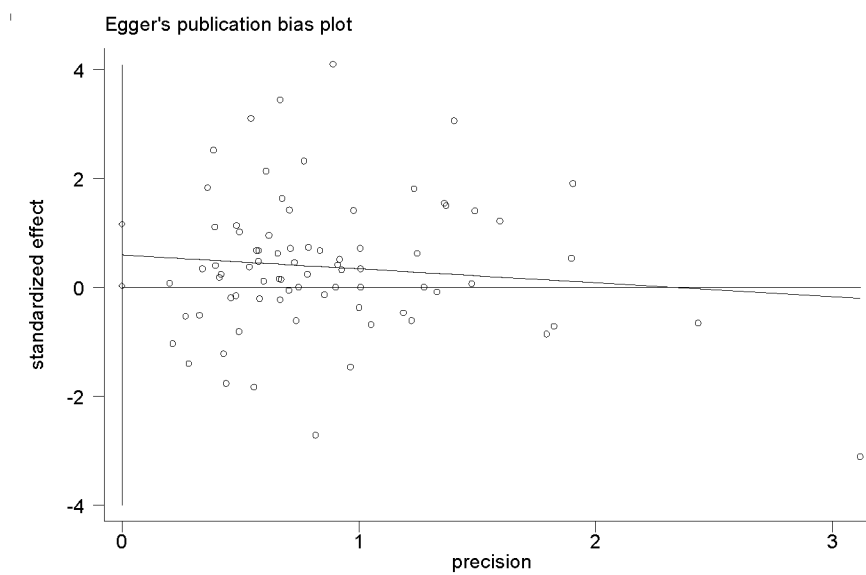
Meta-analysis regression					No of studies = 4	
					tau^2 method	reml
					tau^2 estimate =	.0088
Successive values of tau^2 differ by less than 10^-4 :convergence achieved						
		Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
Stdor		-3.894572	4.187367	-0.93	0.352	-12.10166 4.312516
_cons		.8346116	.65863	1.27	0.205	-.4562795 2.125503

**Πίνακας 8:** Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την εντολή metareg της μετά-παλινδρόμησης.

Όπως παρατηρούμε στο διάγραμμα του Begg δεν υπάρχει συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης καθώς οι μελέτες είναι συμμετρικές δημιουργώντας ένα διάγραμμα «χωνί». Το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρείται και στο διάγραμμα του Egger καθώς το διάστημα εμπιστοσύνης περιέχει την τιμή 0. Ενώ στα αποτελέσματα που προκύπτουν από την εντολή metareg δεν υπάρχει συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης.



**Εικόνα 17:** Το forest plot που παράγεται από την εντολή metabias logOR stdor, gr(b). Στον κάθετο άξονα βρίσκεται το log(odds ratio) ενώ στον οριζόντιο το standard error.



**Εικόνα 18:** Το forest plot που παράγεται από την μέθοδο του Egger.

## 2.9 ΑΘΡΟΙΣΤΙΚΗ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ

Αθροιστική μετα-ανάλυση (cumulative metanalysis) ορίζεται ως η επαναλαμβανόμενη διαδικασία της μετά-ανάλυσης κάθε φορά που μια νέα μελέτη πραγματοποιείται. Συνδυάζει το αποτέλεσμα της προηγούμενης μελέτης αξιολογώντας με αυτόν τον τρόπο τη συμβολή της κάθε μελέτης. Έχουμε την δυνατότητα παρουσίασης γραφημάτων συσσωρευτικών μετα-αναλύσεων υπολογίζοντας τα συσσωρευτικά στοιχεία που προκύπτουν, καθώς κάθε φορά υπολογίζονται οι καινούργιες εκτιμήσεις και τα διαστήματα εμπιστοσύνης. Εντοπίζουμε έτσι πόσο έχουν αλλάξει τα αποτελέσματα με την πάροδο του χρόνου σε σχέση με το αρχικό αποτέλεσμα (Bagos and Nikolopoulos 2009). Με την εντολή αυτή έχουμε την ικανότητα να προσδιορίσουμε εκ των υστέρων την ακριβή στιγμή που μια θεραπεία για κάποια ασθένεια έφτασε σε επίπεδα σημαντικότητας. (Womack et al. 1997) Χρησιμοποιώντας τη παρακάτω εντολή, πραγματοποιούμε την αθροιστική μετά-ανάλυση:

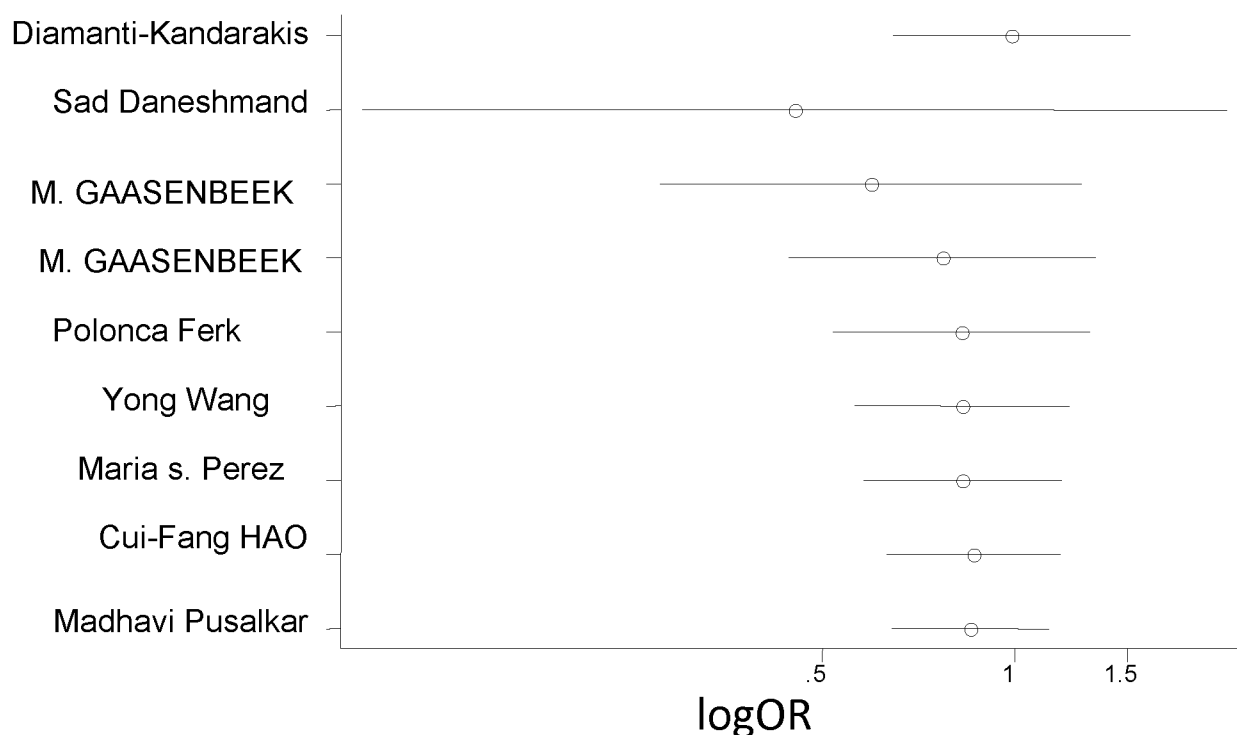
- `metacum logOR stdor, eff(r)gr`  
`xlab(0. 5,1,1. 5) id(author) eform όπου`

***eff(r)gr:*** καθορίζει ότι στο διάγραμμα (gr) που θα παρουσιαστεί θα χρησιμοποιήσουμε το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων (r)

***id(author):*** διαχωρίζουμε την κάθε μελέτη στο διάγραμμα τοποθετώντας τον συγγραφέα στα αριστερά του διαγράμματος.

Στη Εικόνα 19 παρουσιάζεται το forest plot που παράγεται από την εκτέλεση της εντολής για την αθροιστική μετά-ανάλυση. Αριστερά παρουσιάζονται οι συγγραφείς της κάθε μελέτης και στον άξονα x έχουμε το oral που αντιπροσωπεύει το logOR. Παρατηρούμε ότι τα αποτελέσματα των πρώτων μελετών παρουσιάζουν αποκλίσεις. Μετά την τρίτη μελέτη όμως οι εκτιμήσεις δεν επιφέρουν σημαντικές αποκλίσεις.





**Εικόνα 19:** Το forest plot που παράγεται από την αθροιστική μετα-ανάλυση.

Για να ελέγχουμε με περισσότερη ακρίβεια την μεταβολή του effect size ανιχνεύοντας την διαχρονικότητα και συγκεκριμένα στην γενετική επιδημιολογία η ένδειξη αυτή, όπως αναφέραμε και πιο πάνω, ονομάζεται φαινόμενο του Πρωτέα. Σε περίπτωση που τα αποτελέσματα για το φαινόμενο του Πρωτέα βγούν θετικά, υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να έχουμε δηλώσει εσφαλμένα στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα. Για την αποφυγή τέτοιων λαθών εκτελούμε την εντολή metatrend, η οποία είναι μια επέκταση της εντολής metacum και η οποία εκτελεί μια σύγκριση του effect size της πρώτης σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες. Η εντολή που χρησιμοποιούμε στο στατιστικό πακέτο Stata είναι:

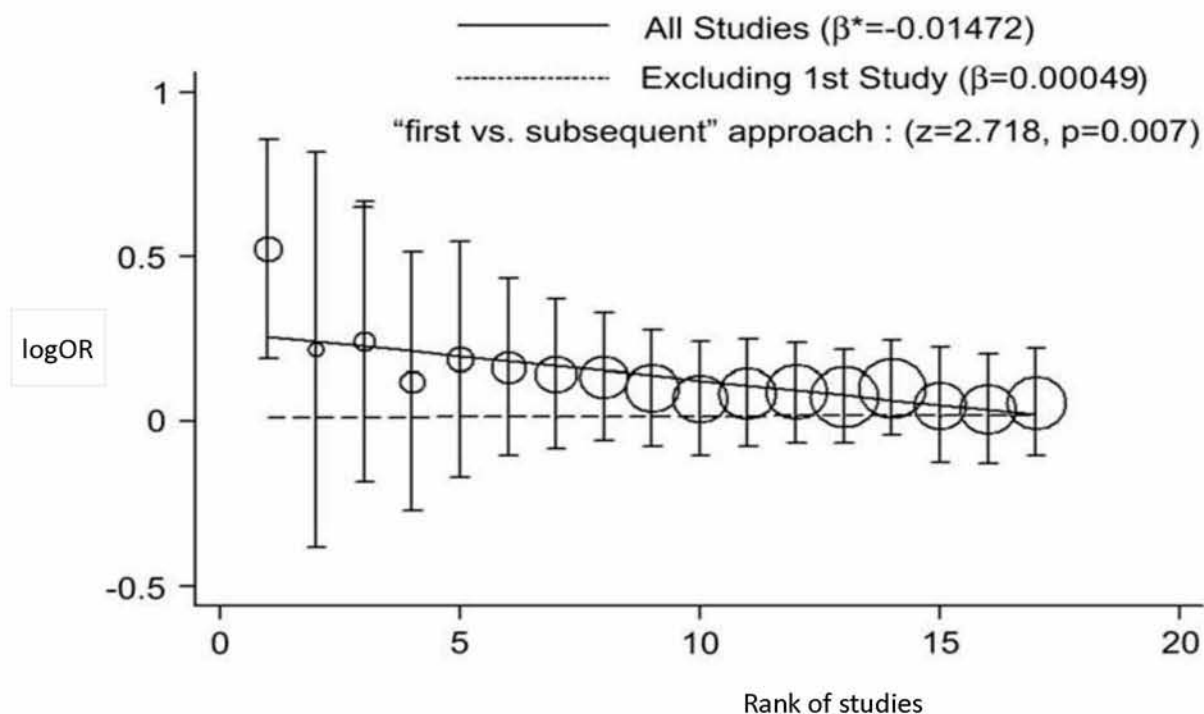
- `metatrend oral stdor`

όπου oral είναι το odds ratio στη λογαριθμική κλίμακα και stdor το standard error.

Ένα ενδεικτικό παράδειγμα με τα αποτελέσματα (Πίνακας 9) και το forest plot που προκύπτει (Εικόνα 20) φαίνονται παρακάτω.

Tests for detecting trends in cumulative meta-analysis						
Number of studies: 9						
'First vs. Subsequent' method						
	Effect Size (ES)	P-value	[95% Conf. Interval]			
First study	0.4547	0.030	0.2237	0.9246		
Subsequent studies	0.9227	0.578	0.6951	1.2248		
All Studies	0.8613	0.310	0.6457	1.1489		
Test for the equality of the ESs						
Ho: ES(first) = ES(subsequent)						
z-value =	-1.815					
P-value =	0.070					
Generalized Least Squares (GLS) Regression-based test						
	Coef.	Std. Err.	P-value	[95% Conf. Interval]		rho
Including all studies	0.07763	0.01917	0.000	0.04005	0.11521	0.651
Excluding first study	0.05991	0.02791	0.032	0.00521	0.11461	0.383

Πίνακας 9: Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την εντολή metatrend όταν την εκτελέσουμε στο Stata.



Εικόνα 20: Το forest plot από την εντολή metatrend.

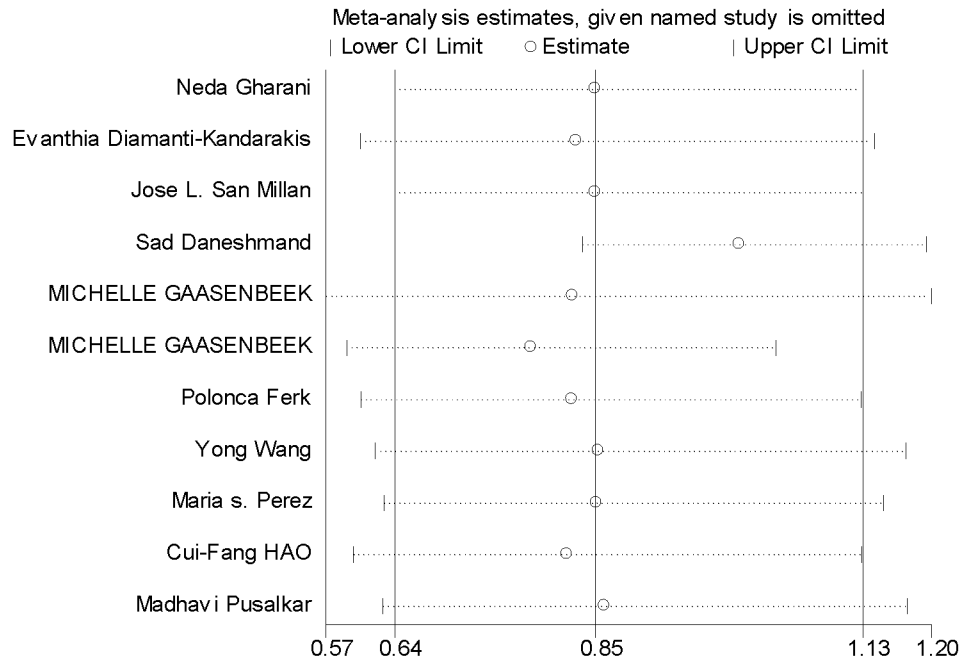
Από τα παραπάνω αποτελέσματα μπορούμε να συμπεραίνουμε ότι δεν υπάρχει διαχρονική τάση όσο αφορά τον έλεγχο της αθροιστικής μετά-ανάλυσης, καθώς ( $p=0.070$ ). Στον έλεγχο της μετά-παλινδρόμησης μπορούμε να δούμε ότι υπάρχει διαχρονική τάση ακόμη και όταν αφαιρούμε την πρώτη μελέτη. Η διαχρονική τάση στο σχήμα μας απεικονίζεται ως η κλίση της ευθείας. Πρέπει να επισημάνουμε τέλος ότι για την πραγματοποίηση των παραπάνω εντολών της αθροιστική μετά-ανάλυσης πρέπει πρώτα οι μελέτες να ταξινομηθούν με βάση την χρονιά που διεξήχθησαν, δηλαδή από την παλαιότερη ως προς την πιο καινούργια.

## 2.10 ΑΦΑΙΡΕΤΙΚΗ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ

Η αφαιρετική μετά-ανάλυση διερευνά την επίδραση μιας ενιαίας μελέτη σε σχέση με το συνολικό αποτέλεσμα της μετά-ανάλυσης. Αυτή η εντολή εμφανίζει γραφικά τα αποτελέσματα της μετά ανάλυσης που προκύπτει κάθε φορά παραλείποντας μια μελέτη. Έχουμε την δυνατότητα να ελέγχουμε την επιρροή που έχει κάθε μελέτη στο συνολικό αποτέλεσμα. Η αφαιρετική μετά-ανάλυση πραγματοποιείται με την εντολή:

```
metainf oral stdor, random eform label(namevar=author)
```

Στο παρακάτω forest plot (Εικόνα 21) που προκύπτει από την εκτέλεση της εντολής `metainf`, παρουσιάζονται τρεις κάθετες γραμμές που αντιπροσωπεύουν το κατώτερο και το ανώτερο όριο του διαστήματος εμπιστοσύνης η δεξιά και η αριστερή αντίστοιχα, ενώ η μεσαία το odds ratio της συνολικής μετά-ανάλυσης. Οι μικροί κύκλοι πάνω στις διακεκομμένες γραμμές αντιπροσωπεύουν το συνολικό odds ratio χωρίς την μελέτη που αναγράφεται στα αριστερά και οι μικρές κάθετες γραμμές το αντίστοιχο διάστημα εμπιστοσύνης.



Εικόνα 21 :Το forest plot που προκύπτει από την εκτέλεση της εντολής metainf.

## 2.11 ΙΣΣΟΡΟΠΙΑ Hardy-Weinberg (HWE)

Η έννοια της ισορροπίας Hardy-Weinberg διατυπώθηκε για πρώτη φορά το 1908 ανεξάρτητα από τον Άγγλο μαθηματικό George Hardy και από έναν Γερμανό γιατρό, τον Wilhem Weinberg. Η θεμελιώδης αρχή της ισορροπίας αναφέρει ότι οι γονότυποι κατανέμονται ανάλογα με τις συχνότητες των ατομικών αλληλομόρφων στο πληθυσμό και η κατανομή παραμένει σταθερή από γενεά σε γενεά. Ο νόμος Hardy-Weinberg ερμήνευσε τα αίτια της σταθερότητας των γονιδιακών συχνοτήτων σε βάθος χρόνου σε έναν πληθυσμό εφαρμόζοντας το διωνυμικό θεώρημα. Υποθέτοντας ότι η συχνότητα του ενός αλληλομόρφου (A) στον πληθυσμό είναι  $p$  και η συχνότητα του άλλου αλληλομόρφου (a) είναι  $q$  τότε εφαρμόζοντας το διωνυμικό θεώρημα προκύπτει ότι  $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ . Ταυτίζοντας το αποτέλεσμα του διωνυμικού αποτελέσματος με τους γονοτύπους στους πληθυσμούς συμπεραίνουμε ότι  $AA = p^2$ ,  $Aa = 2pq$ ,  $aa = q^2$ . Υπάρχουν όμως ορισμένοι παράγοντες που διαφοροποιούν τις γονιδιακές συχνότητες με αποτέλεσμα η ισορροπία Hardy-

Weinberg να μην ισχύει. Για να ισχύει η ισορροπία Hardy-Weinberg απαραίτητο είναι:

1. Το πλήθος των ατόμων στους πληθυσμούς να είναι μεγάλο
2. Οι συζεύξεις που πραγματοποιούνται να είναι τυχαίες και να τηρούν κάποια κριτήρια (όχι σε υποπληθυσμούς π. χ. κωφοί ή αιμομιξία)
3. Δεν πρέπει να υπάρχει επιλογή αλληλομόρφων
4. Τα αλληλόμορφα πρέπει να μεταβιβάζονται από τη μια γενιά στην άλλη χωρίς την δημιουργία κάποιου νέου (μετάλλαξη γονιδίων)
5. Τα αλληλόμορφα πρέπει να μεταβιβάζονται χωρίς να απομακρύνεται κάποιο (μετανάστευση γονιδίων)

Μια μεγάλη ανησυχία αποτελεί το γεγονός ότι υπάρχει η πιθανότητα οι συσχετίσεις να είναι ψευδείς στη περίπτωση που η κατανομή των γονοτύπων αποκλίνει από την ισορροπία Hardy-Weinberg. Γι' αυτό τον λόγο απαραίτητος είναι να ελέγχουμε αν το πλήθος των ατόμων που συμμετέχουν σε μελέτες μετά-ανάλυσης βρίσκονται σε ισορροπία Hardy-Weinberg. Ο έλεγχος της ισορροπίας πραγματοποιείται για κάθε μελέτη ξεχωριστά με την εντολή.

```
genhwi ss0 sl0 ll0
```

Όπου ss0, sl0, ll0 οι γονότυποι των αλληλομόρφων s,l στον υγίη πληθυσμό. Για  $p\text{-value} > 0.05$  ο πληθυσμός βρίσκεται σε ισορροπία. Ένα παράδειγμα εκτέλεσης βρίσκεται παρακάτω (Πίνακας 10). Στη δεύτερη στήλη παρουσιάζονται το πλήθος των ατόμων που παρατηρήθηκε και στην τρίτη στήλη αυτό που έπρεπε κανονικά να υπάρχει σύμφωνα με την ισορροπία HWE. Παρατηρούμε ότι το  $p=0.3469 > 0.05$  άρα ο πληθυσμός που μελετάται στο παράδειγμα βρίσκεται σε ισορροπία HWE.

**Πίνακας 10: Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την εκτέλεση της εντολής genhw με πιθανούς γονότυπους 65 78 32.**

Genotype	Observed	Expected	
AA	65	61. 81	
Aa	78	84. 39	
aa	32	28. 81	
total	175	175. 00	
Allele	Observed	Frequency	Std.
A	208	0. 5943	0. 0272
a	142	0. 4057	0. 0272
total	350	1. 0000	

```

Estimated disequilibrium coefficient (D) = 0. 0183
Hardy-Weinberg Equilibrium Test:
      Pearson chi2 (1) = 1. 003 Pr= 0. 3166
likelihood-ratio chi2 (1) = 1. 000 Pr= 0. 3172
Exact significance prob = 0. 3469

```

## 2.12 ΕΛΕΓΧΟΣ T-TEST

Ο έλεγχος του t-test πραγματοποιείται για να εξετασθεί κατά πόσο διαφέρουν οι μέσες τιμές βιοχημικών δεικτών μεταξύ υγιών και ασθενών. Έστω για παράδειγμα ένα τυχαίο δείγμα από τον πληθυσμό που έχει την ασθένεια,  $X_1, X_2, X_3 \dots X_n$ , και ένα τυχαίο δείγμα από τον πληθυσμό που δεν έχει την ασθένεια,  $Y_1, Y_2, Y_3 \dots Y_n$ . Με τον έλεγχο του t-test θα ελέγχουμε κατά πόσο τα βιοχημικά χαρακτηριστικά όπως ο δείκτης μάζας σώματος και η ολική τεστοστερόνη διαφέρουν μεταξύ ασθενών και υγιών. Η βασική αρχή είναι να ελέγχουμε την μηδενική υπόθεση όπου θεωρούμε ότι οι μέσες τιμές των δύο ομάδων είναι ίσες έναντι της υπόθεσης όπου θεωρούμε ότι οι μέσες τιμές των δύο ομάδων είναι διαφορετικές.

Έχουμε συνεπώς:

$$H_0 : \mu = \mu_0$$

Ως προς τις εναλλακτικές

$$H_a : \mu > \mu_0$$

$$H_a : \mu < \mu_0$$

$$H_a : \mu \neq \mu_0$$

Η μηδενική υπόθεση, την οποία υποτίθεται ισχύει μέχρι να αποδειχθεί το αντίθετο. Απορρίπτουμε την  $H_0$  σε επίπεδο σημαντικότητας 0.05. Στο στατιστικό πακέτο Stata για να πραγματοποιήσουμε αυτό τον έλεγχο εκτελούμε την εντολή

```
ttest totalt1= totalt0
```

όπου στη θέση του totalt1 τοποθετούμε το χαρακτηριστικό της πρώτης ομάδας, στην περίπτωση μας για παράδειγμα την ολική τεστοστερόνη των ασθενών, και στο δεύτερο μέλος το χαρακτηριστικό της δεύτερης ομάδας, στην περίπτωση μας την ολική τεστοστερόνη των υγιών (totalt0).

Ένα ενδεικτικό παράδειγμα αποτελεσμάτων (Πίνακας 11) που προκύπτει από την εκτέλεση της εντολής στο Stata είναι το παρακάτω.

Paired t test							
Variable		Obs	Mean	Std.Err.	Std.Dev.	[95% Conf.Interval]	
totalt1		3	3.163333	.0952774	.1650252	2.753388	3.73279
totalt0		3	1.24	.04	.069282	1.067894	1.412106
Diff		3	1.923333	.0633333	.1096965	1.650832	2.195835
mean(diff)=mean(totalt1 - totalt0)						t =	30.3684
Ho: mean(diff) = 0				degrees of freedom = 2			
Ha: mean(diff) < 0		Ha: mean(diff) != 0		Ha: mean(diff) > 0			
Pr(T < t) = 0.9995		Pr( T  >  t ) = 0.0011		Pr(T > t) = 0.0005			

**Πίνακας 11: Τα αποτελέσματα από τον έλεγχο του t-test.**

Στον παραπάνω πίνακα παρουσιάζεται στην δεύτερη στήλη οι παρατηρήσεις που εντοπίστηκαν για την πρώτη και την δεύτερη ομάδα, στην τρίτη στήλη οι μέσες τιμές, στην τέταρτη στήλη το standard error, στην πέμπτη η τυπική απόκλιση και στην έκτη το διάστημα εμπιστοσύνης. Από τα αποτελέσματα που προκύπτουν συμπεραίνουμε ότι έχουμε μια στατιστικά σημαντική διαφορά των μέσων για το χαρακτηριστικό, ολική τεστοστερόνη στις δύο ομάδες. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι το  $p\text{-value}=0.0011 < 0.05$ , άρα απορρίπτουμε την μηδενική υπόθεση.

## 2.13 META-REGRESSION

Η παλαιότερη μορφή της παλινδρόμησης ήταν η μέθοδος των ελαχίστων τετραγώνων η οποία δημοσιεύθηκε από το Legendre το 1805. Η ανάλυση παλινδρόμησης πρωτοδιατυπώθηκε από τον Άγγλο ευγενή Francis Galton το 1877 για να περιγράψει ένα βιολογικό φαινόμενο. Χρησιμοποιείται συνήθως για να εκτιμηθεί ο βαθμός στον οποίο η ποικιλομορφία ενός χαρακτηριστικού καθορίζεται από γενετικούς παράγοντες (Russel 2009). Η ανάπτυξη των τεχνικών παλινδρόμησης κατά την μετά-ανάλυση επιτρέπει μια πιο ακριβή εξέταση και χρησιμοποιούνται σε πολλές βιοϊατρικές έρευνες (Freemantle et al. 1999). Τέτοιες αναλύσεις όμως πολλές φορές είναι δύσκολο να ερμηνευθούν. Τα μικρά δείγματα ασθενών και οι λίγες μελέτες μπορεί να οδηγήσουν σε σφάλμα. Η ανάλυση παλινδρόμησης ουσιαστικά προσδιορίζει την ευθεία γραμμή με την βέλτιστη προσαρμογή στα δεδομένα. Αυτό σημαίνει ότι ελαχιστοποιούνται οι κάθετες τετραγωνισμένες κάθετες αποστάσεις από τα σημεία ως την ευθεία παλινδρόμησης (Russel 2009). Η γραμμική παλινδρόμηση χρησιμοποιεί τη σχέση μεταξύ της βαθμωτής μεταβλητής  $y$  και ενός ή περισσότερων μεταβλητών  $x$  για να κάνει προβλέψεις.  $X$  είναι η μεταβλητή πρόβλεψης, και  $Y$ , το κριτήριο (ή προβλεπόμενη) μεταβλητή.

Η μαθηματική σχέση που περιγράφει το μοντέλο της γραμμικής παλινδρόμησης είναι:

$$Y = a + bX$$

Στόχος μας είναι να προσαρμόσουμε στα σημεία του δείγματος την καλύτερη ευθεία. Η καλύτερη ευθεία είναι αυτή που δίνει τα μικρότερα σφάλματα πρόβλεψης, τα οποία



ορίζονται ως την απόσταση της παρατηρούμενης μεταβλητής  $y$  από την προσαρμοσμένη ευθεία (Stanley T. D. 2006; Staurinos 2006). Τα  $a$  δηλώνει το σημείο που η ευθεία τέμνει το άξονα  $y$  και το  $b$  προσδιορίζει την κλίση της ευθείας. Η κλίση υποδηλώνει κατά πόσο μεταβάλλεται η μεταβλητή στον άξονα  $x$ . Αν η κλίση δηλαδή το  $b$  είναι μεγαλύτερη του 0 και μικρότερη του 1, η φαινοτυπική ποικιλομορφία πιθανώς να επηρεάζεται από γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Αν η κλίση ισούνται με 1 τότε οφείλεται μόνο σε γενετικούς παράγοντες, ενώ αντίστοιχα αν ισούνται με 0 δεν υπάρχει καθόλου γενετική επίδραση. (Russel 2009)

Στην περίπτωση της μετα-ανάλυσης η εξαρτημένη μεταβλητή  $X$  είναι κάθε φορά τα διάφορα χαρακτηριστικά της ασθένειας και η ανεξάρτητη μεταβλητή  $Y$  είναι το συνολικό  $\log(\text{odds ratio})$  της μετά-ανάλυσης. Πρέπει να επισημάνουμε ωστόσο τον ενδοιασμό για την πιθανότητα των μικρών σφαλμάτων πρόβλεψης από την ευθεία στην ομάδα των ασθενών λόγω του γεγονότος ότι είναι ήδη προσβλημένοι από την ασθένεια. Αντιθέτως τα μικρά σφάλματα πρόβλεψης στην ομάδα των υγιών απόδεικνύουν την πιθανή σχέση των χαρακτηριστικών αυτών με την ασθένεια.

Για την πραγματοποίηση της μετά-παλινδρόμησης στο στατιστικό πακέτο Stata χρησιμοποιούμε την παρακάτω εντολή:

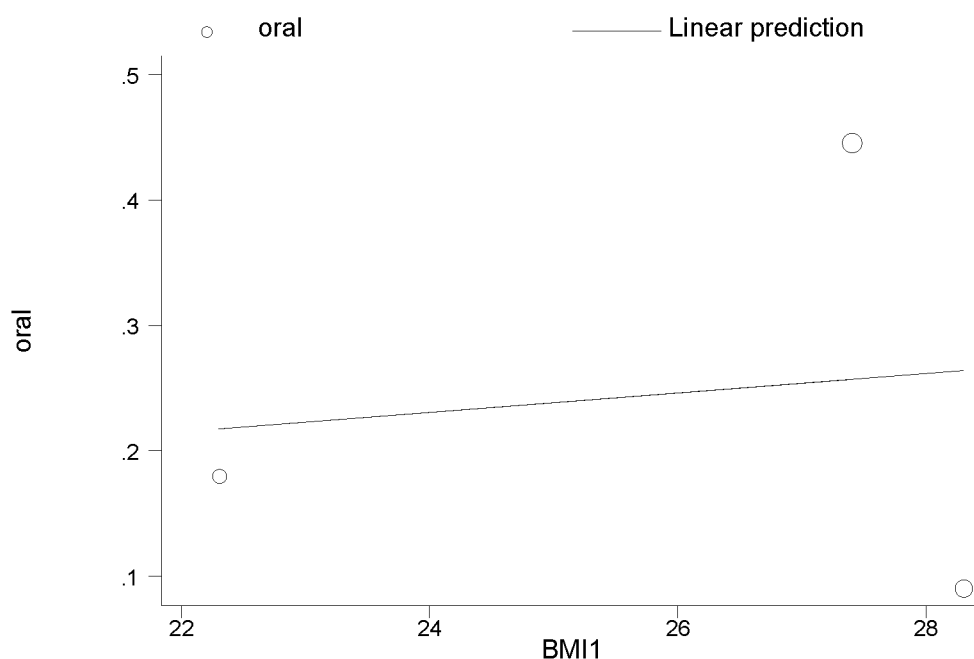
```
metareg oral bml, level(95) wsse(stdor)
predict bmlpred
gr7 oral bmlpred bml [aw=1/stdor^2], xlab ylab s(Oi) c(.1)
```

όπου *oral* είναι το  $\log(\text{odds ratio})$  της μετά-ανάλυσης, *bml* είναι το χαρακτηριστικό για το οποίο θέλουμε να ελέγχουμε αν υπάρχει συσχέτιση με την ασθένεια, δημιουργούμε την μεταβλητή πρόβλεψης *bmlpred* και με την επόμενη εντολή δημιουργούμε το forest plot.

Τα αποτελέσματα (Πίνακας 12) και το forest plot (Εικόνα 22 ) που προκύπτουν από την εκτέλεση της εντολής φαίνονται παρακάτω:

Meta-analysis regression					No of studies = 3	
					tau^2 method reml	
					tau^2 estimate = .0519	
Successive values of tau^2 differ by less than 10^-4 :convergence achieved						
<hr/>						
	Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]	
<hr/>						
bmi1	.0077399	.0636289	0.12	0.903	-.1169704	.1324502
<hr/>						
_cons	.0446492	1.67873	0.03	0.979	-3.245601	3.334899

**Πίνακας 12 :** Τα αποτελέσματα που παράγονται απο την εκτέλεση του meta-regression , όπου παρατηρούμε οτι το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό δεν συσχετίζεται με την ασθένεια καθώς το p- value>0.05



**Εικόνα 22:** Το forest plot που προκύπτει απο την εκτέλεση του meta-regression. Όπως παρατηρούμε τα σφάλματα πρόβλεψης είναι μεγάλα και απέχουν από την ευθεία καθώς η συσχέτιση δεν είναι στατιστικά σημαντική.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### 3.1 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ (TAAAA)<sub>n</sub> ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ SHBG

Έρευνες έχουν διεξαχθεί στο παρελθόν, υποδηλώνουν ότι η μεταγραφική δραστηριότητα του γονιδίου SHBG φαίνεται να επηρεάζεται από την επαναλαμβανόμενη αλληλουχία (TAAAA)<sub>n</sub> στον υποκινητή του, και πιο συγκεκριμένα στο 5' άκρο. (Hogevveen et al. , 2001). Αρκετές από αυτές είχαν ως στόχο να συσχετίσουν τον πολυμορφισμό αυτό με το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών. Ωστόσο όμως τα αποτελέσματα ήταν αμφιλεγόμενα. Στόχος μας είναι ο έλεγχος της στατιστικά σημαντικής βαρύτητας όλων των μελετών που έχουν γίνει μέχρι τώρα για την συσχέτιση αυτού του πολυμορφισμού με το PCOS. Έτσι, με αυτό τον τρόπο στο άμεσο μέλλον η έρευνα αυτή να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικό εργαλείο από τους γιατρούς.

#### ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΜΕΛΕΤΩΝ

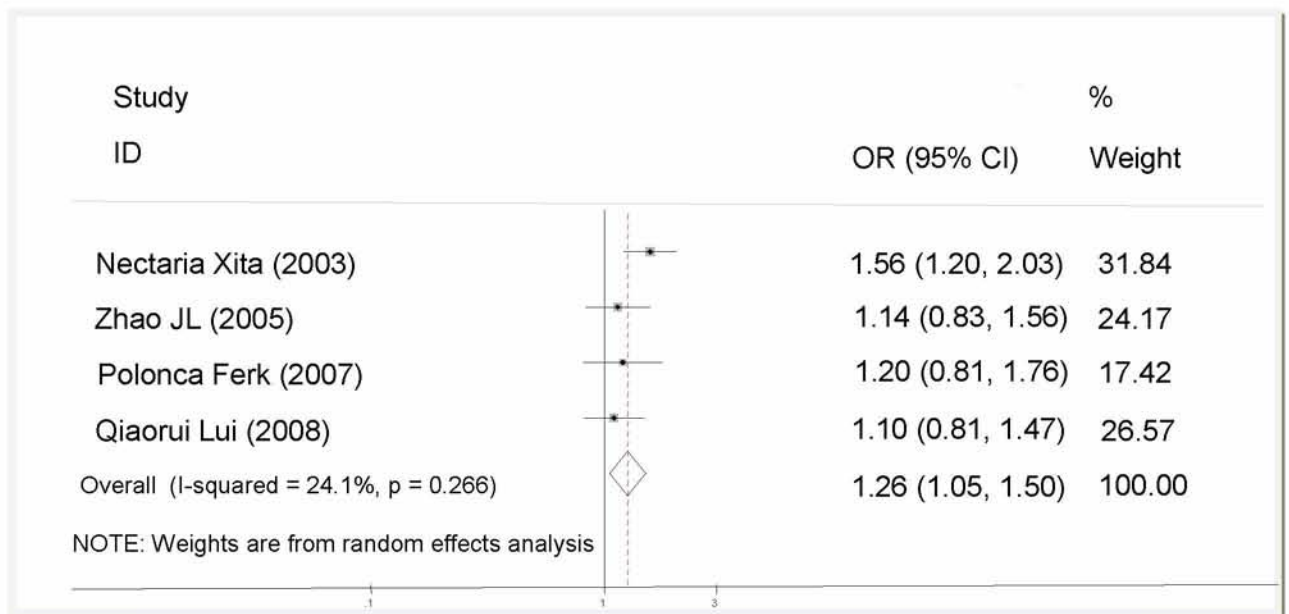
Οι μελέτες που βρέθηκαν να είναι μελέτες ασθενών - μαρτύρων και συμπεριλαμβάνουν τον πολυμορφισμό (TAAAA)<sub>n</sub> και με το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών είναι 7 (Xita, Tsatsoulis et al. 2003; Cousin, Calemard-Michel et al. 2004; Zhao, Chen et al. 2005; Ferk et al. 2007; Liu, Gu et al. 2008; Xita, Georgiou et al. 2008; Xita, Georgiou et al. 2008). Η μια από τις μελέτες (Cousin, Calemard-Michel et al. 2004) περιείχε πληροφορίες μόνο για τα γενικά χαρακτηριστικά των ασθενών που είχαν το γονίδιο SHBG με το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών και δεν περιείχε πληροφορίες για τους γονότυπους ή τα αλληλόμορφα με αποτέλεσμα να μην μπορεί να συμπεριληφθεί στην μετα-ανάλυση. Από τις τρεις μελέτες που διεξήχθη από την N. Xita που αφορούσαν Καυκάσιους πληθυσμούς χρησιμοποιήσαμε μόνο την μία μελέτη (Xita et al. 2003) για την μετά-ανάλυση καθώς οι υπόλοιπες δύο χρησιμοποιούσαν τα ίδια δεδομένα ασθενών

μεταβάλλοντας τον αριθμό των υγιών. Συνεπώς οι Καυκάσιοι πληθυσμοί αποτελούνταν από 185 ασθενείς και 324 υγιείς και οι υπόλοιπες τρεις αφορούσαν Ασιάτες με σύνολο 467 ασθενείς και 441 υγιείς. Ο αριθμός των επαναλήψεων για τον πολυμορφισμό (TAAAA)<sub>n</sub> που βρέθηκαν στις μελέτες κυμαίνονταν από 6-11, οπότε στον πληθυσμό υπάρχουν αλληλόμορφα που ονομάζονται 6, 7, 8, 9, 10 και 11. Κάποιες μελέτες όμως δεν ανέφεραν καθόλου κάποια από αυτά τα αλληλόμορφα λόγω του μικρού αριθμού ασθενών ή υγιών που είχαν τους συγκεκριμένους γονότυπους. Οι περισσότερες μελέτες χαρακτήριζαν τα αλληλόμορφα ως Short(S) όταν η επαναλαμβανόμενη αλληλουχία TAAAA, που εμφανιζόταν στο γονιδίωμα των ανθρώπων περιείχε αριθμό επαναλήψεων μικρότερο ή ίσο του 8 και ως Long(L), τα αλληλόμορφα όταν η επαναλαμβανόμενη αλληλουχία TAAAA που εμφανιζόταν στο γονιδίωμα των ανθρώπων περιείχε αριθμό επαναλήψεων μεγαλύτερο του 8. Για τον λόγο αυτό θεωρήσαμε για την μετα-ανάλυσή τα αλληλόμορφα Short $\leq$ 8 και Long $>$ 8. Μια από τις μελέτες (Xita et al. 2003) ωστόσο καθορίζει διαφορετικό κατώφλι για τους γονότυπους Short και Long καθώς τοποθετεί κάποιους γονότυπους που συμπεριλαμβάνουν το αλληλόμορφο 8 στους Short όπως 7/8 και κάποιους άλλους στους Long όπως 8/8, ενώ παράλληλά διέθετε το κατώφλι Short για  $<$ 8 και Long για  $>$ 8 για τα αλληλόμορφα μόνο. Για την πραγματοποίηση της μετα-ανάλυσης ακολουθήσαμε την ονοματολογία της δημοσίευσης για τους γονότυπους. Για να ελέγξουμε όμως ωστόσο αν η επιλογή μας ήταν σωστή πραγματοποιήσαμε τον έλεγχο και για τα αλληλόμορφα μόνο με short  $<$ 8 και για Long  $>$ 8. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν ήταν παρόμοια (στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα), χωρίς σημαντική διαφορά. Τα δεδομένα τόσο για τα αλληλόμορφα S, L όσο και για τους γονότυπους SS, SL, LL φαίνονται στον Πίνακα 13.

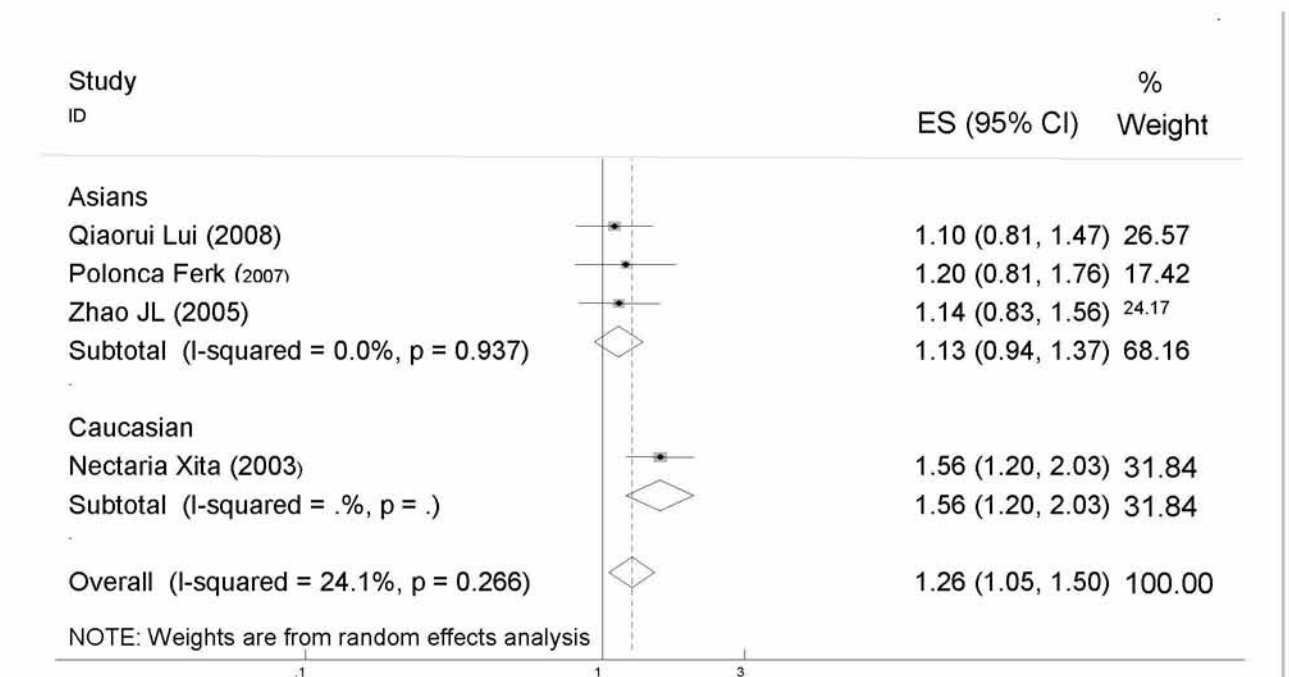
Για την πραγματοποίηση της μετα-ανάλυσης ελαττώσαμε τις συγκρίσεις των γονοτύπων, στις συγκρίσεις SS+SL versus LL και SS versus SL+LL, για την διευκόλυνση του υπολογισμού του odds ratio. Πραγματοποιώντας αυτές τις συγκρίσεις σκοπός ήταν να ελέγξουμε τον κίνδυνο για PCOS θεωρώντας τόσο το επικρατές μοντέλο όσο και το υπολειπόμενο μοντέλο κληρονομικότητας αντίστοιχα.

Αρχικά ελέγξαμε για PCOS από τα **αλληλόμορφα**. Βρέθηκε μια στατιστικά σημαντική συσχέτιση 1.26 και διάστημα εμπιστοσύνης 95% (CI) [1.053 1.50].

Πραγματοποιήσαμε τόσο τον έλεγχο για όλες τις φυλές μαζί όσο και για κάθε φυλή ξεχωριστά. (Εικόνα 23, Εικόνα 24).

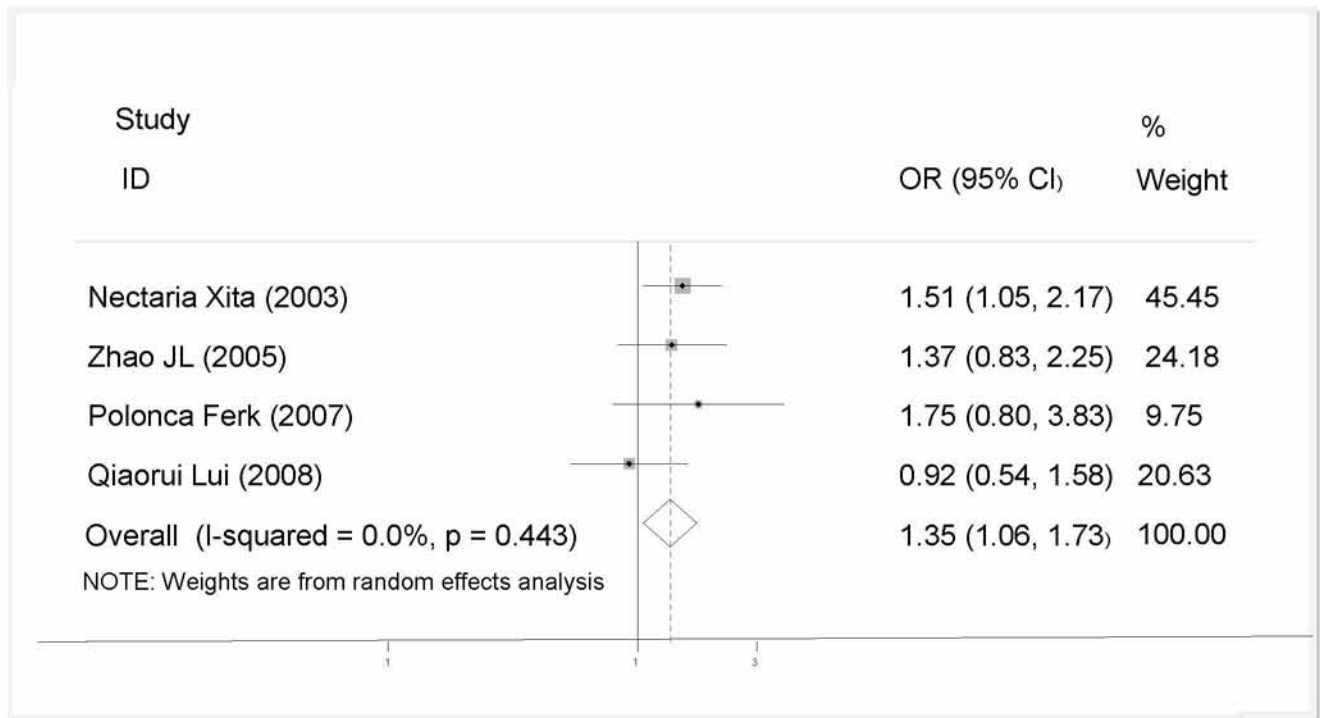


**Εικόνα 23 :** Το forest plot που προκύπτει από την πραγματοποίηση της μετα-ανάλυσης του γονιδίου SHBG των αλληλομόρφων I versus s.



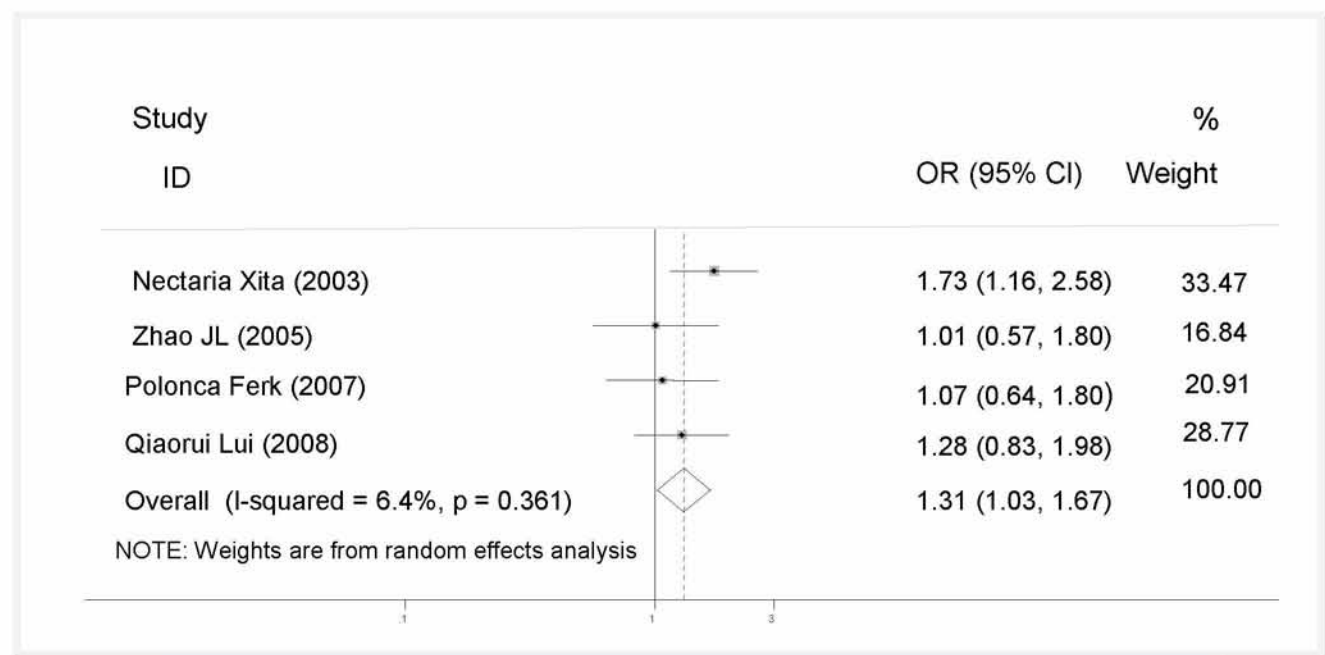
**Εικόνα 24:** Το forest plot που προκύπτει από την μετα-ανάλυση των αλληλομόρφων I versus s, εκτελώντας την εντολή metan. Οι μελέτες είναι ταξινομημένες σύμφωνα με την φυλή στην οποία ανήκουν.

Ελέγξαμε την σύγκριση για το **υπολειπόμενο μοντέλο κληρονομικότητας** δηλαδή Για την σύγκριση LL versus SS+SL. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν είναι στατιστικά σημαντικά ( $p = 0.016$ ) με ένα σχετικό κίνδυνο 1.350 (1.057 – 1.726) όπως φαίνεται στην Εικόνα 25.



**Εικόνα 25 :** Το forest plot που προκύπτει από την πραγματοποίηση της μετα-ανάλυσης των γονοτύπων II versus ss+sl , εκτελώντας την εντολή metan.

Παρομοίως ελέγξαμε για το επικρατές μοντέλο κληρονομικότητας δηλαδή για την σύγκριση LL+SL versus SS. Τα ευρήματα ήταν επίσης στατιστικά σημαντικά ( $p = 0.029$ ) με ένα σχετικό κίνδυνο 1.310 (1.028 – 1.670). Για τον έλεγχο για την κάθε φυλή ξεχωριστά τόσο για το επικρατές όσο και για το υπολειπόμενο μοντέλο κληρονομικότητας βλέπε Παράρτημα σελ. 122, σελ. 125 αντίστοιχα



**Εικόνα 26:** Το forest plot που προκύπτει από την πραγματοποίηση της μετα-ανάλυσης για τους γονοτύπους ss versus ll+sl, εκτελώντας την εντολή metan.

Όλες οι συγκρίσεις, και για τα αλληλόμορφα και για το υπολειπόμενο και για το επικρατές μοντέλο, που πραγματοποιήθηκαν παρουσιάζουν **μικρή ετερογένεια** (Πίνακας 16, στήλες 6, 7, 8, 9). Ο έλεγχος για το σφάλμα δημοσίευσης τόσο με το τεστ του Begg, του Egger και την μέθοδο της μετά-παλινδρόμησης έδειξε **απουσία συστηματικού σφάλματος δημοσίευσης** (Πίνακας 16). Τα αποτελέσματα για τα αλληλόμορφα, το επικρατές και το υπολειπόμενο μοντέλο τόσο για όλες τις φυλές μαζί όσο και για κάθε φυλή ξεχωριστά φαίνονται συγκριτικά στον Πίνακα 15. Παρατηρούμε ότι για όλες τις συγκρίσεις οι Καυκάσιοι, που είναι ουσιαστικά μια μόνο μελέτη, που τυχαίνει να είναι και η πρώτη έχουν ένα πολύ υψηλό κίνδυνο σε σχέση με τον κίνδυνο που παρουσιάζεται στους Ασιάτες.



AUTHOR	YEAR	LOCATION	RACE	CASES						CONTROLS					
				TOTAL1	SS1	SL1	LL1	S1	L1	TOTAL0	SS0	SL0	LL0	S0	L0
Qiaorui Lui	2008	China	Asians	187	59	96	32	214	160	175	65	78	32	208	142
Polonca Ferk	2007	Slovenia	Asians	123	57	45	21	159	87	110	52	47	11	151	69
Nectaria Xita	2003	Ioannina	Caucasian	185	47	45	93	139	231	324	120	74	130	314	334
Zhao JL	2005	China	Asians	157	28	81	48	137	177	156	28	90	38	146	166

**Πίνακας 13: Οι γονότυποι και τα αλληλόμορφα που χρησιμοποιήθηκαν στην μετα-ανάλυση για τον πολυμορφισμό (TAAAA)<sub>n</sub>.**

AUTHOR	YEAR	LOCATION	RACE	CASES				CONTROLS			
				SHBG1	BMI1	T1	LH/FSH1	SHBG0	BMI0	T0	LH/FSH
Qiaorui Lui	2008	China	Asians	33.8	28.3	3.16	1.43	65.58	20.48	1.2	0.57
Polonca Ferk	2007	Slovenia	Asians	44.4	22.3	3.0	2.1	61.0	21.2	1.2	0.52
Nectaria Xita	2003	Ioannina	Caucasian	40.52	27.4	3.33	1.31	59.7	21.99	1.32	1.06
Zhao JL	2005	China	Asians	.	.	.	.	.	.	.	.

**Πίνακας 14: Πίνακας για τα χαρακτηριστικά των ασθενών και των υγιών που έχουν το γονίδιο SHBG.**

Contrast	Race	Number of studies	Odds ratio (random	95% Confidence interval	Cochran's Q	P-value for heterogeneity	I squared	Between studies variance
<b>I allele versus s allele</b>								
	All	4	1. 257	1. 053 1. 500	3. 95	0. 266	24. 1%	0. 0079
	Caucasian	1	1. 562	1. 204 2. 028	0. 00	.	. %	0. 0000
	Asian	3	1. 133	0. 939 1. 368	0. 13	0. 937	0. 0%	0. 0000
<b>ss genotype versus sl+ll</b>								
	All	4	1. 310	1. 028 1. 670	3. 21	0. 361	6. 4%	0. 0040
	Caucasian	1	1. 727	1. 157 2. 578	0. 00	.	. %	0. 0000
	Asian	3	1. 142	0. 856 1. 524	0. 51	0. 776	0. 0%	0. 0000
<b>ll genotype versus ss+sl</b>								
	All	4	1. 350	1. 057 1. 726	2. 68	0. 443	0. 0%	0. 0000
	Caucasian	1	1. 509	1. 048 2. 171	0. 00	.	. %	0. 0000
	Asian	3	1. 232	0. 881 1. 722	2. 03	0. 362	1. 5%	0. 0014

**Πίνακας 15 : Τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης για τον πολυμορφισμό (TAAAA)η του γονιδίου SHBG.**

	Test Begg	Test Egger	Meta-regression
I allele versus s allele	0.303	0.414	0.352
ss genotype versus sl+ll	0.734	0.891	0.933
ll genotype versus ss+sl	0.089	0.085	0.101

**Πίνακας 16: Τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης για το publication bias για το τζστ του Begg , του Egger και ο έλεγχος ετερογένειας με meta-regression.**

## ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟΤΗΤΑΣ

Τα παρόμοια αποτελέσματα από τους προηγούμενους υπολογισμούς δεν μας επιτρέπουν να ξεχωρίσουμε τον τρόπο κληρονομικότητας του συνδρόμου σε σχέση με τον πολυμορφισμό του γονιδίου. Συνεπώς, χρησιμοποιήσαμε την μέθοδο που αναφέραμε προηγουμένως με σκοπό την προσέγγιση του γενετικού μοντέλου κληρονομικότητας του γονιδίου (Bagos 2007; Bagos 2008). Υπολογίσαμε αρχικά τα ( $\log(\text{odds ratio})$ ) για το επικρατές και το υπολειπόμενο μοντέλο συμβολίζοντάς τα ως  $b_1$ ,  $b_2$ , όπως φαίνεται παρακάτω. Ο υπολογισμός των  $b_1$ ,  $b_2$  γίνεται ως εξής:

Για το επικρατές μοντέλο

$$b_1 = \log((s_{11}/s_{s1}) / (s_{10}/s_{s0}))$$

Για το υπολειπόμενο μοντέλο

$$b_2 = \log((l_{11}/s_{s1}) / (l_{10}/s_{s0}))$$

Το  $b_1$  συμβολίζει το odds ratio του επικρατούς μοντέλου κληρονομικότητας (SL versus SS) σε λογαριθμική κλίμακα ενώ το  $b_2$  το odds ratio το μοντέλο του υπολειπόμενου τρόπου κληρονομικότητας (LL versus SS) αντίστοιχα. Ύστερα υπολογίσαμε τις διακυμάνσεις και τη συνδιακύμανση ως εξής:

$$\text{generate } V_{11} = 1/s_{s0} + 1/s_{10} + 1/s_{s1} + 1/s_{11}$$

$$\text{generate } V_{22} = 1/s_{s0} + 1/s_{s1} + 1/l_{10} + 1/l_{11}$$

$$\text{generate } V_{12} = 1/s_{s0} + 1/s_{s1}$$

Έτσι εκτελώντας την παρακάτω εντολή:

$$\text{mvmeta } b \text{ } V, \text{vars}(b_1 \text{ } b_2)$$

και από τον υπολογισμό του λάμδα ( $\lambda$ ) μπορούμε να βγάλουμε κάποιο συμπέρασμα για το γενετικό μοντέλο κληρονομικότητας

$$\lambda = d_i \text{ } \_b[b_1] / \_b[b_2]$$

				Number of obs	=	4
Log likelihood = -1.8257719				Wald chi2(2)	=	7.48
				Prob > chi2	=	0.0238
<hr/>						
		Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
<hr/>						
Overall_mean						
b1		.1841579	.138955	1.33	0.185	-.0881889 .4565048
b2		.3998049	.1462214	2.73	<b>0.006</b>	.1132162 .6863935
<hr/>						
Estimated between-studies SDs and correlation matrix:						
	SD	b1	b2			
b1	.07224719	1	1			
b2	.00241299	1	1			

**Πίνακας 17: Τα αποτελέσματα που προκύπτουν για τον τρόπο μεταβίβασης του γονιδίου SHBG.**

Από τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρούμε ότι το p-value για το  $b2 = .0006 < 0.05$  που είναι στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα. Από τον υπολογισμό του lamda που προκύπτει από την εντολή `di _b[b1]/_b[b2]` έχει ως αποτέλεσμα τον αριθμό .46061958 που βρίσκεται πολύ κοντά στο 0.5.

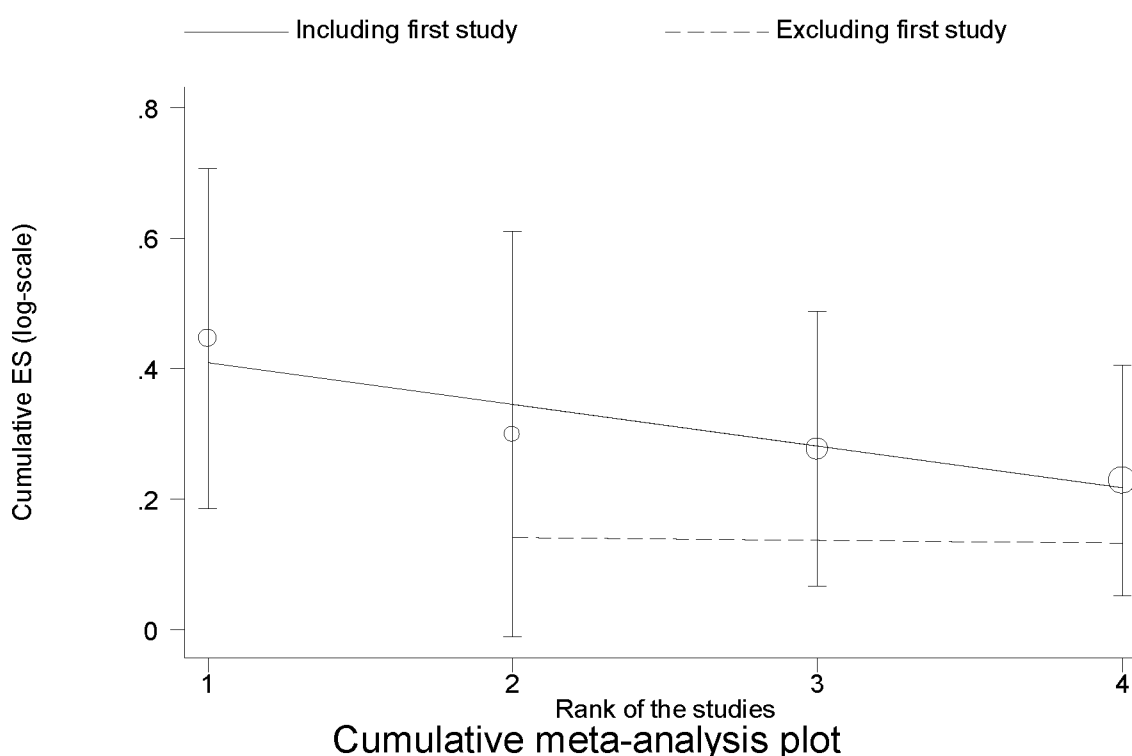
Υπενθυμίζουμε ότι αν το lamda βρίσκεται κοντά στο 0, θεωρούμε υπολειπόμενο μοντέλο κληρονομικότητας. Όταν βρίσκεται κοντά στο 1, επικρατές μοντέλο ενώ όταν η τιμή βρίσκεται κοντά στο 0.5 θεωρούμε ότι ο πολυμορφισμός και συνεπώς η εμφάνιση της ασθένειας κληρονομείται με συνεπικρατές τρόπο.

Άρα, από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι το γενετικό μοντέλο κληρονομικότητας είναι πιθανώς συνεπικρατές.

Το γονίδιο είναι συνεπικρατές, άρα, μεγαλύτερη βαρύτητα δίνουμε στη μετα-ανάλυση των αλληλομόρφων. Το Odds ratio για τα αλληλόμορφα L versus S είναι 1.26 (Πίνακας 15). Αυτό σημαίνει ότι τα άτομα που έχουν ένα L αλληλόμορφο έχουν αυξημένη πιθανότητα κατά 26%, ενώ τα άτομα που έχουν δύο αλληλόμορφα έχουν αυξημένο κίνδυνο κατά 52% σε σχέση με τον φαινότυπο SS.

## ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΤΟΥ ΠΡΩΤΕΑ

Ο έλεγχος για το φαινόμενο του Πρωτέα έδειξε ότι υπάρχει διαχρονική τάση. Το φαινόμενο αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι η πρώτη μελέτη εμφάνισε ένα πολύ υψηλό κίνδυνο 1.5624 σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν αργότερα που είχαν ένα σχετικό κίνδυνο 1.1335. (Εικόνα 30) Αυτό αποδεικνύεται από το  $p\text{-value}=0.051$  της αθροιστικής μετα-ανάλυσης και από το  $p=0.0000$  με τον έλεγχο της μετά-παλινδρόμησης. Τα αποτελέσματα αυτά φανερώνουν την ύπαρξη αντιφατικών αποτελεσμάτων και κατά συνέπεια την ύπαρξη του φαινομένου του Πρωτέα. Το γεγονός αυτό δηλώνει ότι το αποτέλεσμα μας είναι υπερεκτιμημένο σε σχέση με την πρώτη μελέτη και ο πραγματικός κίνδυνος υπάρχει πιθανότητα να είναι μικρότερος του 1.26.



**Εικόνα 30:** Το διάγραμμα από την αθροιστική μετα-ανάλυση όπου φαίνεται ότι υπάρχει το φαινόμενο του Πρωτέα.

## ΕΛΕΓΧΟΣ T-TEST

Ελέγξαμε με το t-test την διαφορά των μέσων τιμών των χαρακτηριστικών των υγιών σε σχέση με τους ασθενείς και από τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p=0.0407$ ) των μέσων για τα επίπεδα της πρωτεΐνης SHBG και για την ολική τεστοστερόνη ( $p=0.0011$ ). Οι μέσες τιμές τους διέφεραν και πιο συγκεκριμένα οι ασθενείς είχαν σε πολύ μικρότερο επίπεδο της πρωτεΐνης της SHBG και σε μεγαλύτερο επίπεδο το ποσοστό της ολικής τεστοστερόνης σε σχέση με τους υγιείς 60.39 vs 38.95 και 1.28 vs 3.18 αντίστοιχα. Το γεγονός αυτό ισχυροποιεί τις ήδη υπάρχουσες υποθέσεις ότι οι ασθενείς με PCOS παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα τεστοστερόνης και μειωμένα επίπεδα της πρωτεΐνης SHBG (Πίνακας 18, Πίνακας 19)

Paired t test						
Variable	Obs	Mean	Std.Err.	Std.Dev.	[95% Conf.Interval]	
totalt1	3	3.163333	.0952774	.1650252	2.753388	3.73279
totalt0	3	1.24	.04	.069282	1.067894	1.412106
Diff	3	1.923333	.0633333	.1096965	1.650832	2.195835
mean(diff)=mean(totalt1 - totalt0)					t =	30.3684
Ho: mean(diff) = 0			degrees of freedom = 2			
Ha: mean(diff) < 0		Ha: mean(diff) != 0		Ha: mean(diff) > 0		
Pr(T < t) = 0.9995		Pr( T  >  t ) = 0.0011		Pr(T > t) = 0.0005		

**Πίνακας 18: Τα αποτελέσματα του t-test για τον έλεγχο των μέσων τιμών της τεστοστερόνης.**

Paired t test						
Variable	Obs	Mean	Std.Err.	Std.Dev.	[95% Conf.Interval]	
serums~1	3	39.57333	3.09635	5.363035	26.25082	52.89585
serums~0	3	62.09333	1.783268	3.088711	54.42055	69.76612
diff	3	-22.52	4.689521	8.122489	-42.69738	-2.342619
mean(diff) = mean(serumshbg1 - serumshbg0)					t =	-4.8022
Ho: mean(diff) = 0			degrees of freedom = 2			
Ha: mean(diff) < 0		Ha: mean(diff) != 0		Ha: mean(diff) > 0		
Pr(T < t) = 0.0204		Pr( T  >  t ) = 0.0407		Pr(T > t) = 0.9796		

**Πίνακας 19: Τα αποτελέσματα του t-test για τον έλεγχο των μέσων τιμών μέσων για τα επίπεδα της πρωτεΐνης SHBG.**

## ΜΕΤΑ-ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗ

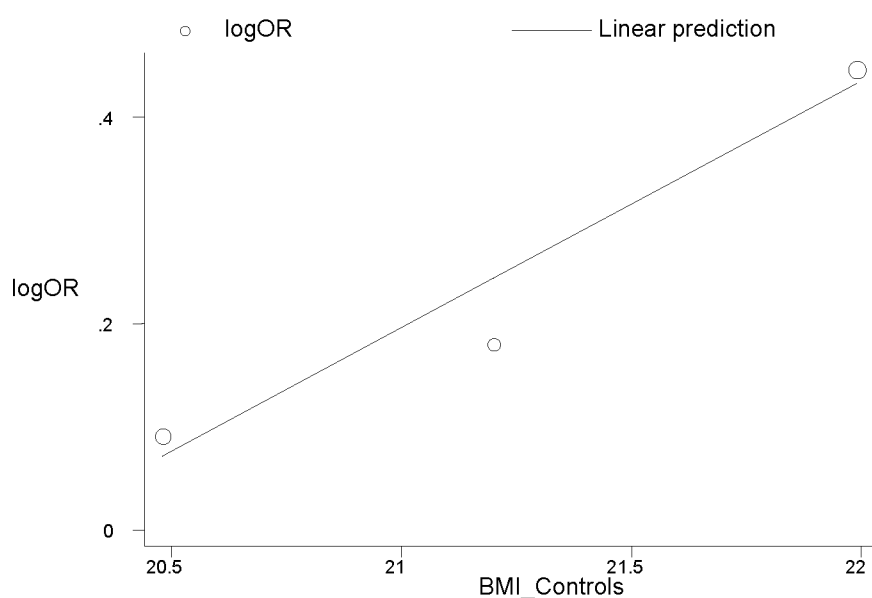
Επιπλέον θελήσαμε να ελέγξουμε την εκτίμηση του βαθμού συσχέτισης των βιοχημικών χαρακτηριστικών, όπως η τεστοστερόνη και η πρωτεΐνη SHBG με τα αλληλόμορφα L. Με αυτό τον τρόπο έχουμε την δυνατότητα να διερευνήσουμε αν ο αυξημένος κίνδυνος για PCOS από το αλληλόμορφο L οφείλεται στα βιοχημικά χαρακτηριστικά, δηλαδή ελέγχουμε τη σχέση για τη συσχέτιση γονοτύπου φαινοτύπου (μέση διαφορά των βιοχημικών χαρακτηριστικών) και γονοτύπου - ασθένειας. Πιο αναλυτικά, εξετάζουμε αν τα αλληλόμορφα L επηρεάζουν τα βιοχημικά χαρακτηριστικά και αυτά με την σειρά τους προκαλούν την ασθένεια του PCOS (αν κάποιο από τα βιοχημικά χαρακτηριστικά αποτελεί το ενδιάμεσο προϊόν). Η μέθοδος που χρησιμοποιήσαμε για αυτή την ανάλυση είναι η μετά-παλινδρόμησης (meta-regression). Τα βιοχημικά χαρακτηριστικά που μελετήσαμε ήταν τα επίπεδα του SHBG, η ολική τεστοστερόνη (T), ο δείκτης μάζας σώματος (BMI) και τα επίπεδα της ωχρίνοτρόπου προς την θυλακιοτρόπο ορμόνη (LH/FSH). Οι μελέτες που περιείχαν δεδομένα για τα βιοχημικά χαρακτηριστικά είναι ήταν τρεις. Τα δεδομένα και οι τιμές για τα βιοχημικά χαρακτηριστικά ξεχωριστά φαίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 14.

Ανακαλύψαμε στατιστικά μη σημαντικά ευρήματα για το δείκτη μάζας σώματος, τα επίπεδα της πρωτεΐνης SHBG, την ολική τεστοστερόνη (T) και τα επίπεδα της ωχρίνοτρόπου προς την θυλακιοτρόπο ορμόνη (LH/FSH). Πρέπει να αναφέρουμε όμως ότι τα p-value για το δείκτη μάζας σώματος, την ολική τεστοστερόνη (T) και τα επίπεδα της ωχρίνοτρόπου προς την θυλακιοτρόπο ορμόνη (LH/FSH) ήταν 0.072, 0.072 και 0.077, που βρίσκονται πολύ κοντά στο 0.05. Επίσης, τα p-value αυτά βρέθηκαν στον έλεγχο των τιμών των βιοχημικών χαρακτηριστικών για τους υγιείς. Στην περίπτωση που η ισχυρή ένδειξη βρισκόταν για τις τιμές των βιοχημικών χαρακτηριστικών των ασθενών υπήρχε μεγάλη πιθανότητα η ένδειξη αυτή να προέκυπτε πιθανώς λόγω της αυξημένης ποσότητας τεστοστερόνης, αυξημένου BMI, αυξημένου LH/FSH ως σύμπτωμα και όχι ως αίτιο.

Υπενθυμίζω ότι όταν η κλίση της ευθείας βρίσκεται ανάμεσα στο 0 και στο 1 τότε μπορεί να επηρεάζεται από γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Αξιοσημείωτο λοιπόν, είναι το γεγονός ότι η κλίση της ευθείας για την ολική τεστοστερόνης (T), το δείκτη μάζας σώματος (BMI) και τα επίπεδα της

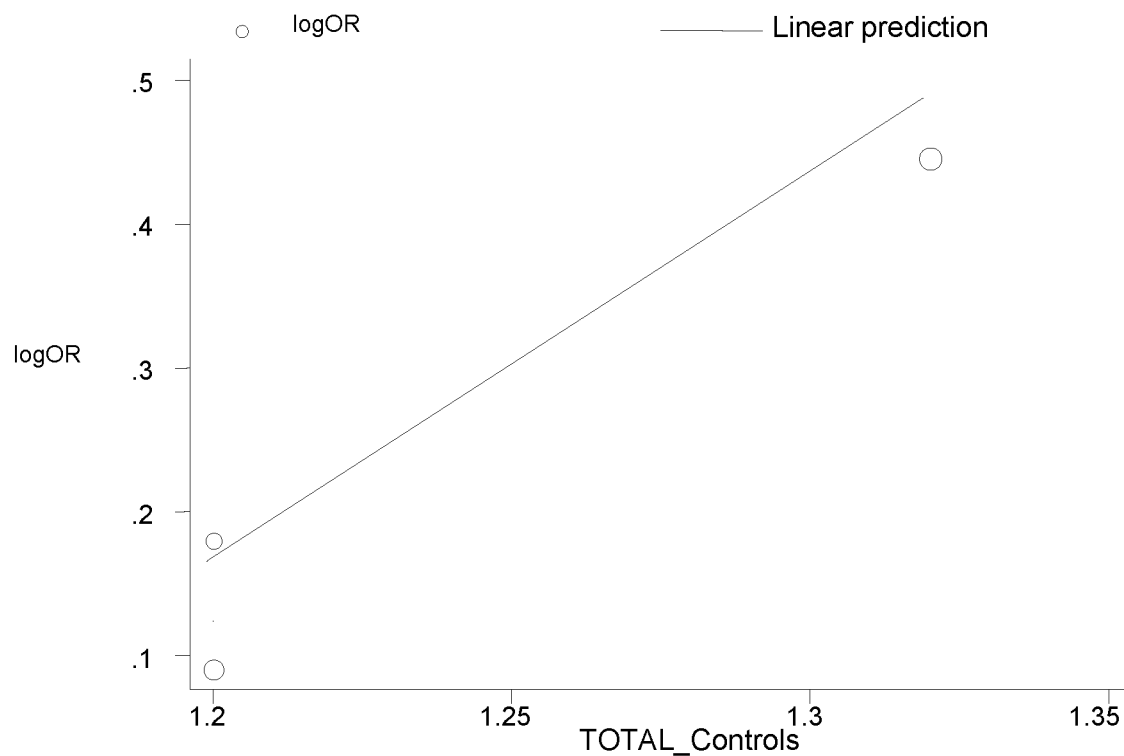
ωχρίνοτρόπου προς την θυλακιοτρόπο ορμόνη (LH/FSH) και τα επίπεδα της πρωτεΐνης SHBG (Εικόνα 27, Εικόνα 28, Εικόνα 29, Εικόνα 30 ) είναι ανάμεσα στο 0 και στο 1. Πιο συγκεκριμένα, οι κλίσεις είναι 0.62, 0.53, 0.81, 0.102 αντίστοιχα για τα χαρακτηριστικά που προαναφέραμε. Είναι απαραίτητο να δώσουμε ιδιαίτερη προσοχή όμως στα αποτελέσματά που προέκυψαν, καθώς ο μικρός αριθμός μελετών προσδίδουν στα αποτελέσματα την πιθανότητα σφάλματος τύπου 2 (επισφαλή αποτελέσματα). Έχει αποδειχθεί στις μεθόδους μετα-παλινδρόμησης ότι τα αποτελέσματα μπορεί να είναι επισφαλή στην περίπτωση ετερογένειας, πολλών συμπαράγοντων (covariates) και λίγων μελετών όπως στη περίπτωση μας (τρεις μελέτες) (Higgins and Thompson 2004).

Ένα σημαντικό αποτέλεσμα της μετά-παλινδρόμησης είναι ότι για να υπήρχε συσχέτιση των βιοχημικών χαρακτηριστικών με τον κίνδυνο του αλληλομόρφου L, οι κλίσεις θα έπρεπε να εμφανιστούν ακριβώς αντίθετα. Δηλαδή για το BMI, T, LH/FSH που εμφανίζονται αυξημένα στους ασθενείς με PCOS, η κλίση θα έπρεπε να ήταν αρνητική ενώ για τα επίπεδα της πρωτεΐνης SHBG που εμφανίζονται μειωμένα στους ασθενείς με PCOS, η κλίση θα έπρεπε να ήταν θετική.

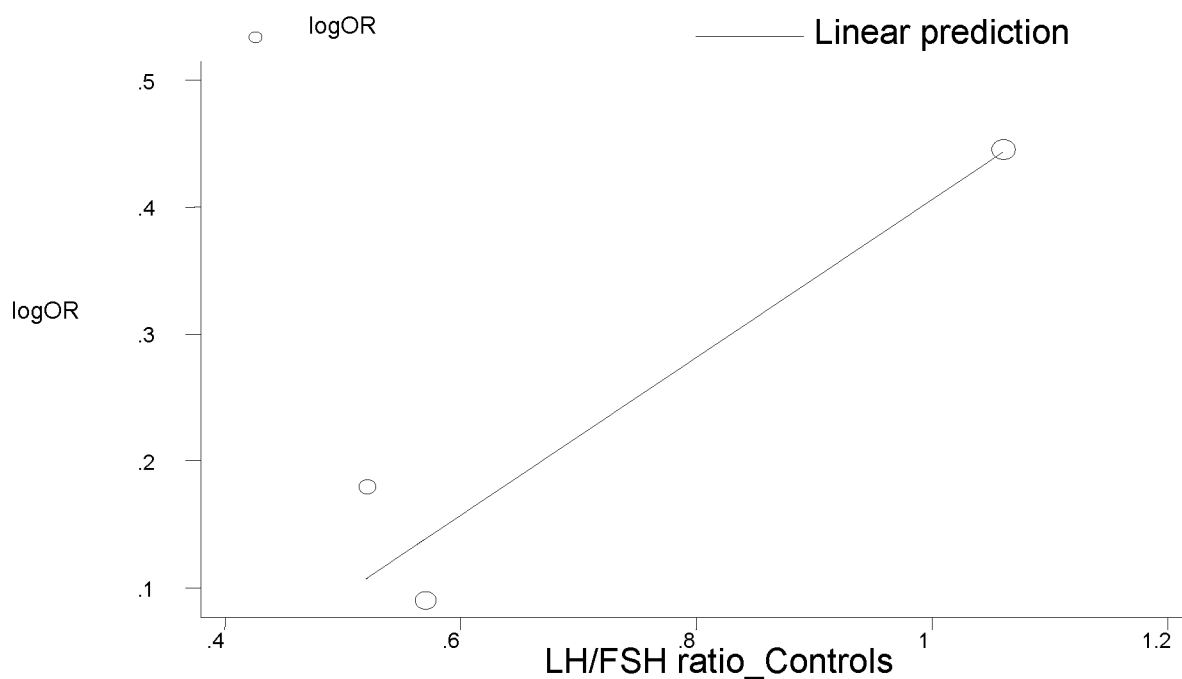


**Εικόνα 27:** Το διάγραμμα που παράγεται από το meta-regression του δείκτη μάζας σώματος των υγιών. Στον κάθετο άξονα εμφανίζεται το log(odds ratio) που προκύπτει από τα αλληλόμορφα του γονιδίου SHBG και στον οριζόντιο άξονα ο δείκτης μάζας σώματος των υγιών.

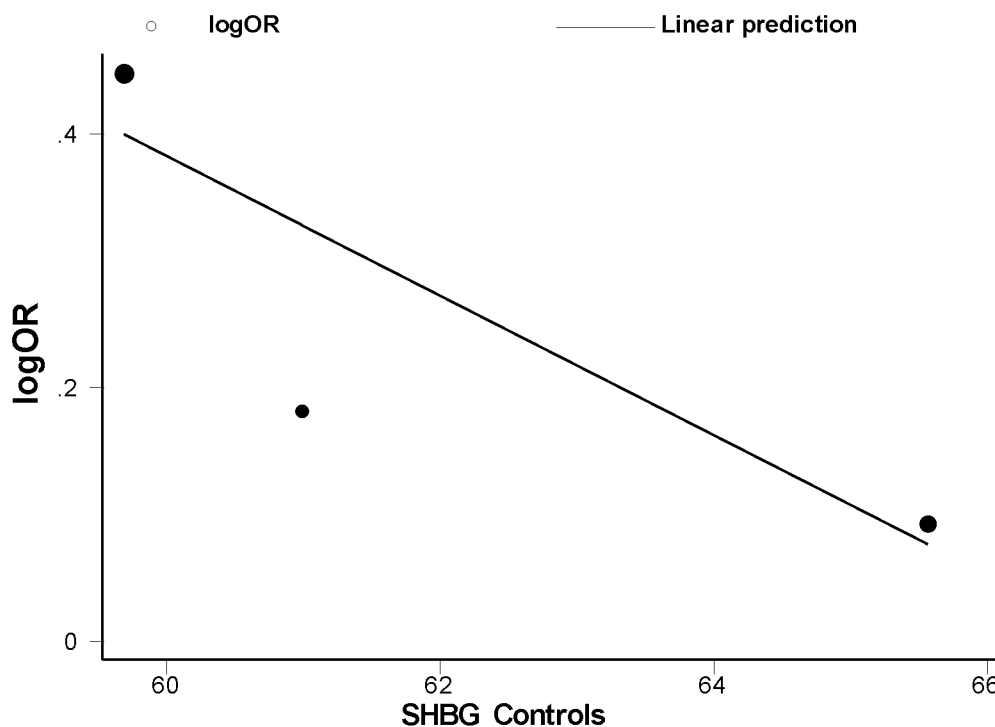




Εικόνα 28: Το διάγραμμα που παράγεται από το metaregression της ολικής τεστοστερόνης των υγιών. Στον κάθετο άξονα εμφανίζεται το log(odds ratio) που προκύπτει από τα αλληλόμορφα του γονιδίου SHBG και στον οριζόντιο άξονα η ολική τεστοστερόνη(T0) των υγιών.



Εικόνα 29: Το διάγραμμα που παράγεται από το metaregression του λόγου της ωχρινιτρόπου προς τη θυλακιοτρόπου ορμόνης των υγιών. Στον κάθετο άξονα εμφανίζεται το log(odds ratio) που προκύπτει από τα αλληλόμορφα του γονιδίου SHBG και στον οριζόντιο άξονα LF/FSH των υγιών.



Εικόνα 30: Το διάγραμμα που παράγεται από το metaregression του λόγου της πρωτεΐνης SHBG τη υγιών. Στον κάθετο άξονα εμφανίζεται το  $\log(\text{odds ratio})$  που προκύπτει από τα αλληλόμορφα του γονιδίου SHBG και στον οριζόντιο άξονα η πρωτεΐνη SHBG των υγιών.

Μια πιθανή εξήγηση για την εμφάνιση αυτών των κλίσεων στις ευθείες στον έλεγχο της μετα-παλινδρόμησης είναι η εξής:

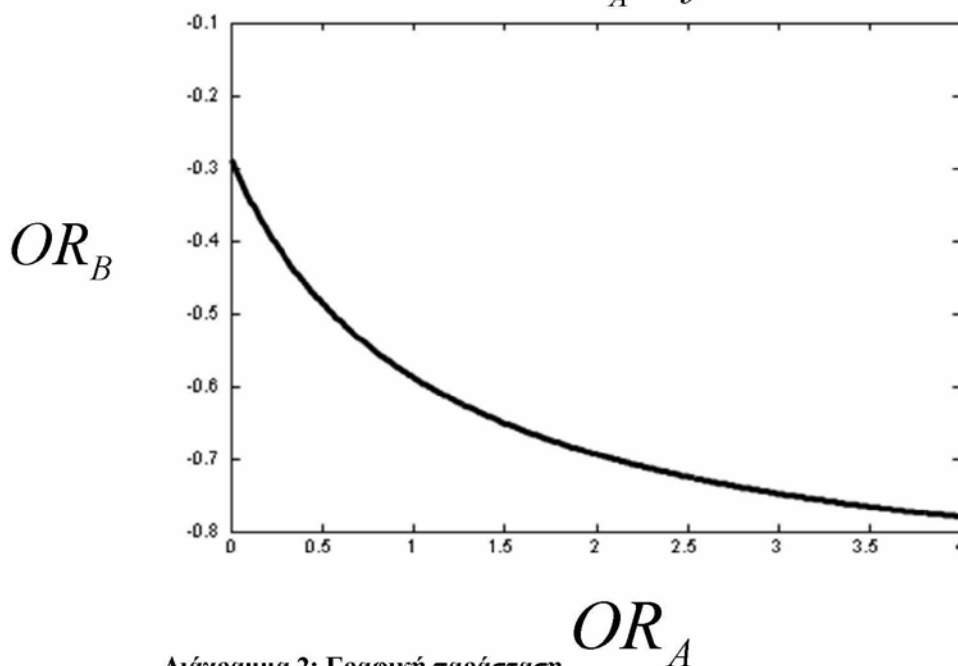
Η Zondervan (Zondervan and Cardon 2004) περιγράφει μαθηματικά πώς συνδέονται δύο γενετικοί τόποι που βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης, ο γενετικός τόπος δείκτης και ο γενετικός τόπος που περιέχει το πραγματικό γονίδιο που προκαλεί την εμφάνιση της ασθένειας. Καθένας από τους δύο έχει 2 αλληλόμορφα, ο δείκτης έχει το αλληλόμορφο B, που μπορεί να εμφανίζεται πιο συχνά στην ασθένεια και το αλληλόμορφο b, ενώ ο δεύτερος γενετικός τόπος έχει το αλληλόμορφο A που είναι το υπεύθυνο για τη νόσο και το αλληλόμορφο a που θεωρείται λιγότερο επικίνδυνο. Βάση, λοιπόν, του τύπου [1] η Zondervan (Zondervan and Cardon 2004) περιγράφει πως το odds ratio του αλληλομόρφου δείκτη B (πιθανότητα κάποιου πολυμορφισμού, B, που βρίσκεται πολύ κοντά στο αλληλόμορφο που προκαλεί την ασθένεια, A)

επηρεάζεται από 4 παράγοντες. Από το OR του αλληλομόρφου που προκαλεί την ασθένεια (A) , από την ανισορροπία σύνδεσης του αλληλομόρφου που προκαλεί την ασθένεια και αλληλομόρφου δείκτη, την συχνότητα του αλληλομόρφου που προκαλεί την ασθένεια και του αλληλομόρφου δείκτη.

$$OR_B = \frac{(1-r)(OR_A f_{AB} + f_{Ab})}{r(OR_A f_{aB} + f_{ab})} \quad [1]$$

Όπου  $OR_A$  είναι ο κίνδυνος για το αλληλόμορφο που προκαλεί το PCOS στην πραγματικότητα, το  $OR_B$  ο κίνδυνος για το αλληλόμορφο δείκτη B, το  $r$  η συχνότητα του πληθυσμού των υγιών για το δείκτη B και  $f_{xy}$  οι συχνότητες των απλοτύπων των ατόμων που έχουν τους συνδυασμούς των γονοτύπων AB, Ab , aB, ab. Γνωρίζοντας ότι οι συχνότητες των απλοτύπων και ο πληθυσμός  $r$  είναι θετικοί αριθμοί, η εξίσωση 1 μετατρέπεται στη εξίσωση 2, όπου  $e, c, d, f$  είναι θετικοί αριθμοί. Η γραφική παράσταση της εξίσωσης 2 είναι της παρακάτω μορφής (διάγραμμα 2). Από την γραφική παράσταση φαίνεται ότι όσο αυξάνεται ο κίνδυνος για το αλληλόμορφο A ( $OR_A$ ), μειώνεται ο κίνδυνος για το δείκτη B ( $OR_B$ ).

$$OR_B = \frac{cOR_A + d}{eOR_A + f} \quad [2]$$



Διάγραμμα 2: Γραφική παράσταση

Προς αυτή την κατεύθυνση μας οδηγούν και μερικές μελέτες (Cousin et al. 2004; Bendlova et al. 2007; Ferk et al. 2007) που δείχνουν ότι ο πολυμορφισμός (TAAAA)<sub>n</sub> του γονιδίου SHBG βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης με τον πολυμορφισμό D327N που βρίσκεται στο εξώνιο 8 του γονιδίου SHBG. Έτσι, στη δική μας περίπτωση πιθανόν ο πολυμορφισμός D327N ή και κάποιος άλλος θα μπορούσε να είναι υπεύθυνος για την εμφάνιση της ασθένειας και ο πολυμορφισμός (TAAAA)<sub>n</sub> να αποτελεί το γενετικό δείκτη, με το L να αντιστοιχεί στο B, και το A να αντιστοιχεί στο επικίνδυνο αλληλόμορφο του πραγματικού γονιδίου που προκαλεί το PCOS σύμφωνα με τον τύπο 1. Ο πολυμορφισμός D327N μετατρέπει το ασπαραγινικό οξύ, που είναι όξινο αμινοξύ (GAU ή GAC) σε ασπαραγίνη, που είναι βασικό αμινοξύ (AAU ή AAC), δηλαδή μετατρέπει το G σε A. Το αλληλόμορφο N του πολυμορφισμού D327N εισάγει μια πρόσθετη N-γλυκοζυλίωση που έχει βρεθεί ότι οδηγεί σε αύξηση του χρόνου ζωής της ανθρώπινης SHBG (Cousin et al. 1998). Έχει επίσης δειχθεί ότι το αλληλόμορφο N συνδέεται με τις 8 επαναλήψεις στον πολυμορφισμό (TAAAA)<sub>n</sub> (Ferk et al 2007). Λόγω αυτής της παρατηρούμενης ανισορροπία σύνδεσης αλλά και επειδή η αλλαγή αμινοξέος και η αύξηση του χρόνου ζωής της πρωτεΐνης SHBG πιθανόν να έχουν αντίθετα αποτελέσματα στη λειτουργία της πρωτεΐνης, δεν είναι ακόμη γνωστή πραγματική επίδραση του D327N πολυμορφισμού στο φαινότυπο. Οι μελέτες όμως, που περιείχαν πλήρη δεδομένα για τον πολυμορφισμό D327N ήταν μόνο δύο, και δεν ήταν αρκετές για την πραγματοποίηση μετα-ανάλυσης.

### 3.2 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ (TTTTA)<sub>n</sub> ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ CYP11a

#### ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΜΕΛΕΤΩΝ

Οι μελέτες που βρέθηκαν για τον πολυμορφισμό (TTTTA)<sub>n</sub> του γονιδίου CYP11a σε συνδυασμό με το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών είναι 11 (Gharani et al. 1997; Diamanti-Kandarakis et al. 2000; San Millan et al. 2001; Daneshmand et al. 2002; Gaasenbeek et al. 2004; Wang et al. 2005; Ferk et al. 2006; Wang et al. 2006; Perez et al. 2008; Hao et al. 2009; Pusalkar et al. 2009). Μία από τις μελέτες (Wang et al. 2005) ωστόσο χρησιμοποιούσε τα ίδια δεδομένα με την (Wang et al. 2006) καθώς η πρώτη ήταν στα κινέζικα και η δεύτερη μεταφρασμένη στα αγγλικά. Για τον λόγο αυτό στη μελέτη μας χρησιμοποιήσαμε μόνο τη μελέτη (Wang et al. 2006). Η μελέτη (Gaasenbeek et al. 2004) περιείχε δύο ξεχωριστούς πληθυσμούς για τον πολυμορφισμό (TTTTA)<sub>n</sub> οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν και οι δύο στη μελέτη. Τα αλληλόμορφα του γονιδίου CYP11a είναι 4, 6, 7, 8, 9, 10, που αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των επαναλήψεων της αλληλουχίας TTTTA. Οι μελέτες προσπαθούσαν να συσχετίσουν το αλληλόμορφο 4R- με την ασθένεια του PCOS. Οι συγκρίσεις που θα πραγματοποιήσουμε θα δείξουν αν υπάρχει στατιστικά σημαντική βαρύτητα μεταξύ των μελετών που βρέθηκαν για τον πολυμορφισμό του γονιδίου CYP11a.

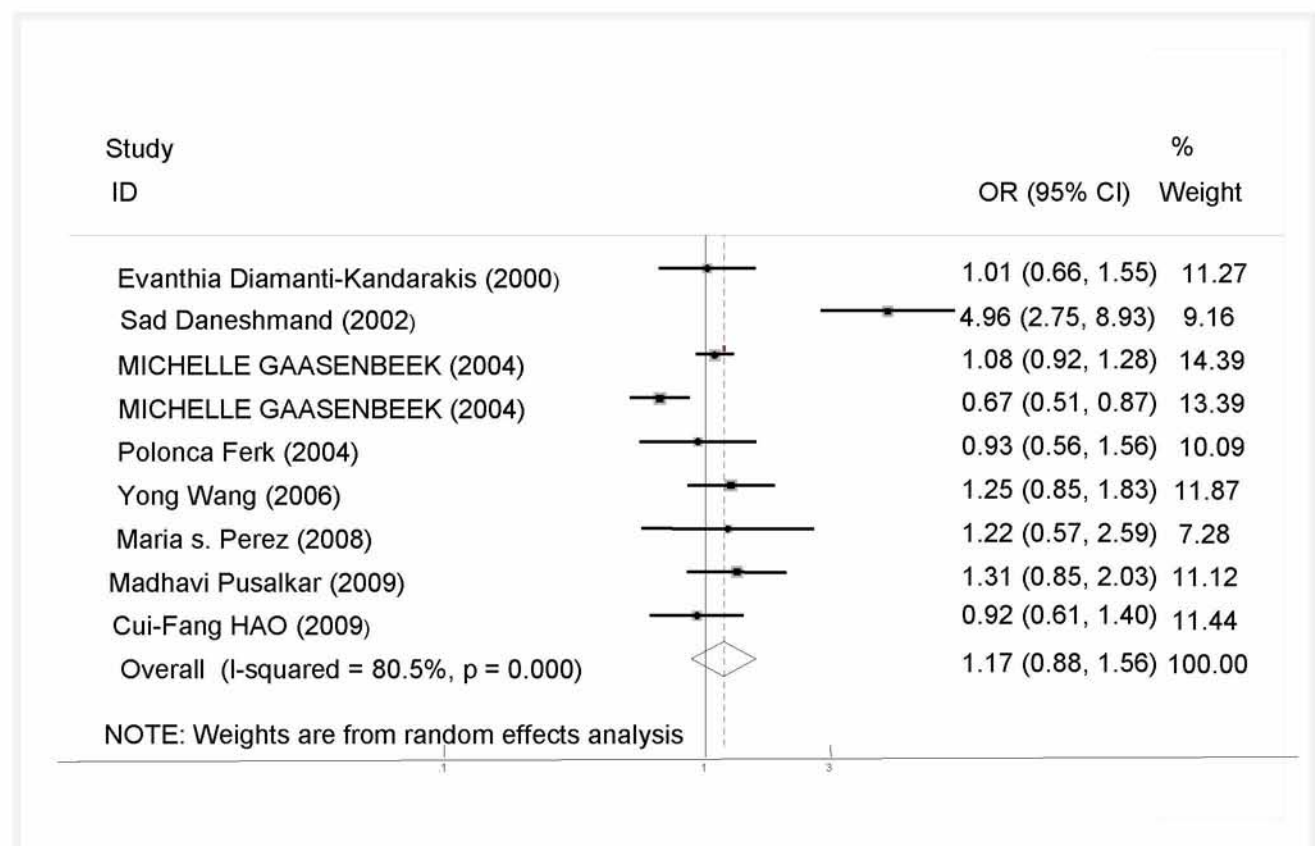
Οι περισσότερες μελέτες χρησιμοποιούσαν μόνο τα αλληλόμορφα 4, 6 και 8 καθώς οι ασθενείς και οι υγιείς που είχαν τα υπόλοιπα αλληλόμορφα ήταν ελάχιστοι. Διαχωρίσαμε το σύνολο των ασθενών των μελετών σε δύο ομάδες για την πραγματοποίηση συγκρίσεων τόσο για τους γονότυπους όσο και για τα αλληλόμορφα. Στην πρώτη ομάδα καταχωρήσαμε αυτούς που είχαν ένα τουλάχιστον ένα αλληλόμορφο 4 χαρακτηρίζοντάς τους ως 4R+ και στη δεύτερη ομάδα τους υπόλοιπους χαρακτηρίζοντάς τους ως 4R-. Τα δεδομένα για τα αλληλόμορφα και για τους γονότυπους φαίνονται πιο ξεκάθαρα και για κάθε μελέτη ξεχωριστά στον Πίνακα 20. Πρέπει να επισημάνουμε ότι δεν περιείχαν όλες οι μελέτες δεδομένα για τους γονότυπους και για τα αλληλόμορφα.

Πίνακας 20: Οι γονότυποι και τα αλληλόμορφα που χρησιμοποιήθηκαν στην μετα-ανάλυση για τον πολυμορφισμό (TTTTA)n. g4r11 είναι το 4R+ των γονοτύπων των ασθενών, g4r01 είναι το 4R- των γονοτύπων των ασθενών, a4r11 είναι το 4R+ των αλληλομόρφων των ασθενών, a4r01 είναι το 4R- των αλληλομόρφων των ασθενών, g4r10 είναι το 4R+ των γονοτύπων των υγιών, g4r00 είναι το 4R- των γονοτύπων των υγιών, a4r10 είναι το 4R+ των αλληλομόρφων των υγιών και a4r00 είναι το 4R- των αλληλομόρφων των υγιών.

	AUTHOR	YEAR	LOCATION	RACE	CASES				CONTROLS					
					g4r11	g4r01	a4r11	a4r01	TOTAL1	g4r10	g4r00	a4r10	a4r00	TOTAL0
1	Evanthia Diamanti-Kandarakis	2000	Greece	caucasians	59	21	84	76	80	78	12	95	85	90
	Madhavi Pusalkar	2009	India	other	37	63	51	149	100	46	54	62	138	100
3	YONG WANG	2006	China	Asians	59	143	70	334	202	56	91	61	233	147
4	MICHELLE GAASENBEEK	2004	UK	caucasians	408	59	603	331	467	827	117	1253	635	944
5	MICHELLE GAASENBEEK	2004	UK	caucasians	170	23	261	125	193	271	65	391	281	336
6	Jose' L. San Milla' n	2001	Spain	caucasians	27	7			34	25	8	34	32	33
7	Neda Gharani	1996	Australia	caucasians	72	25			97	95	15			110
8	Sai'd Daneshmand	2002	California	caucasians			14	88	51			247	313	280
9	Polonca Ferk	2004	Slovenia	caucasians	44	14	59	57	58	44	14	57	59	58
10	Cui-Fang HAO	2009	China	Asians	49	70	62	186	124	49	72	57	185	121
11	Maria s. Perez	2008	Argentina	Asians			41	23	64			39	18	57

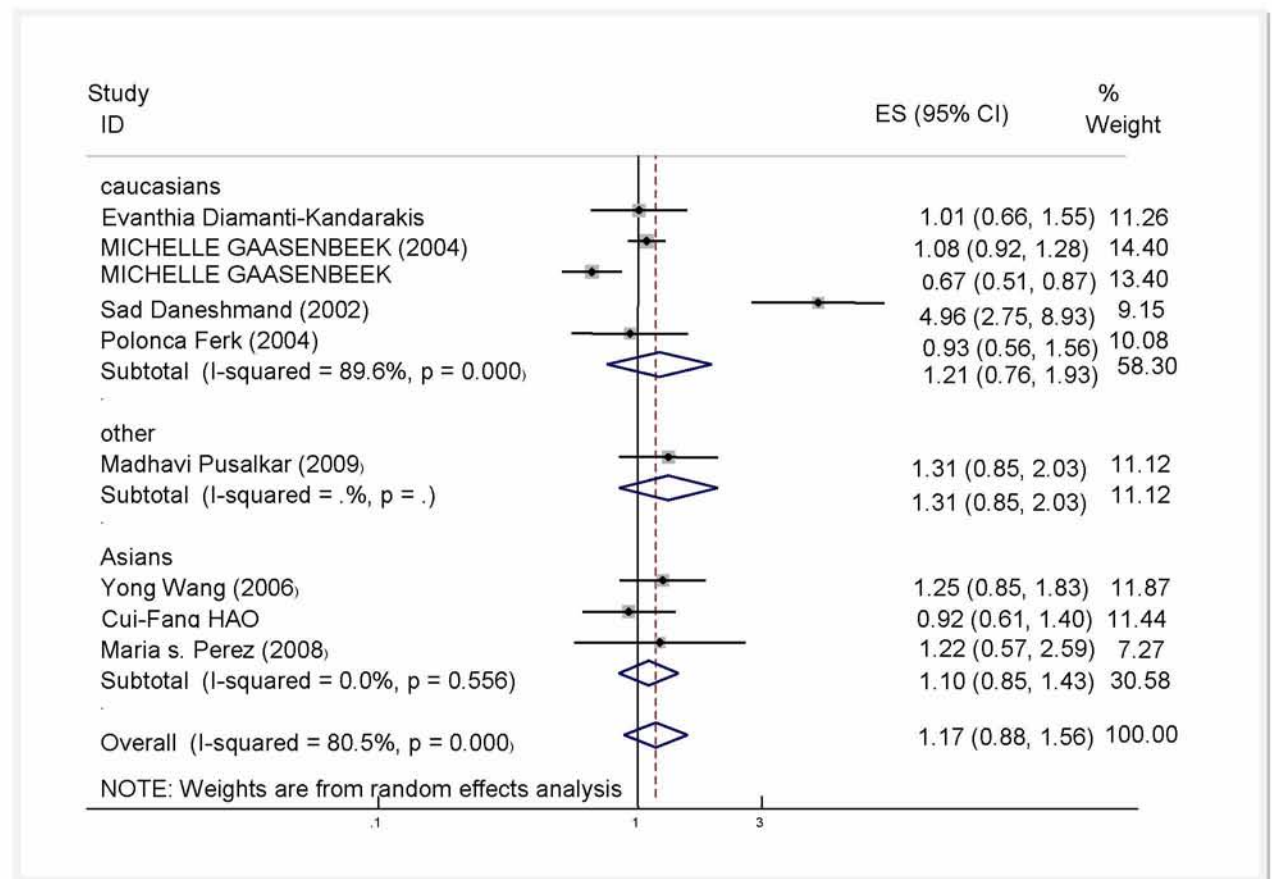
Για τα **αλληλόμορφα** συμπεριλήφθηκαν οι μελέτες 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10 και 11 σύμφωνα με τον Πίνακα 22. Πραγματοποιήθηκε λοιπόν σύγκριση για τα αλληλόμορφα 4R- versus 4R+. Υπολογίσαμε τον κίνδυνο τόσο για όλες τις φυλές μαζί (Εικόνα 31) (Παράρτημα Πίνακας 8) όσο και για κάθε φυλή ξεχωριστά με σκοπό να εντοπίσουμε πιθανές διαφορές (Εικόνα 32).

Όπως βλέπουμε στο παρακάτω διάγραμμα ο κίνδυνος είναι 1.17 που σημαίνει ότι τα άτομα που έχουν τουλάχιστον ένα 4 αλληλόμορφο έχουν 17% μεγαλύτερη πιθανότητα να εμφανίσουν την νόσο. Τα αποτελέσματα ωστόσο ήταν **στατιστικά μη σημαντικά** καθώς το  $p\text{-value}=0.268$  που είναι πολύ μεγαλύτερο από το 0.05.



**Εικόνα 31:** Το forest plot που προκύπτει από την μετα-ανάλυση των αλληλομόρφων 4R- versus 4R+, εκτελώντας την εντολή metan.

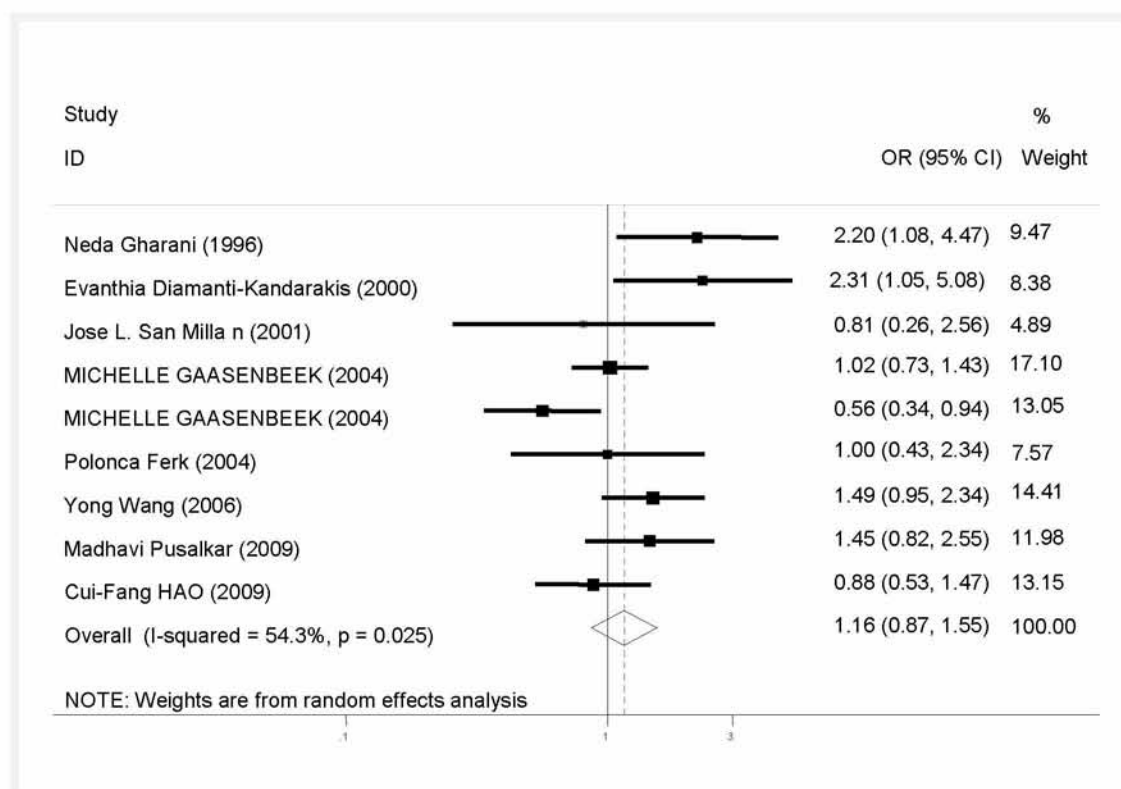
Όσο αφορά την σύγκριση για τη κάθε φυλή ξεχωριστά από την παρακάτω Εικόνα (Εικόνα 32 ) μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι συμπεριλαμβάνονται αρκετές φυλές (Καυκάσιοι, Ασιάτες και άλλοι) και έχουμε έτσι την δυνατότητα να ελέγξουμε τον κίνδυνο για κάθε φυλή ξεχωριστά (Παράρτημα Πίνακας 9).



**Εικόνα 32 :** Το forest plot που προκύπτει από την σύγκριση των αλληλομόρφων 4R- versus 4R+ για κάθε φυλή ξεχωριστά, εκτελώντας την εντολή metan.



Για τους **γονότυπους** χρησιμοποιήθηκαν οι μελέτες 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 και 10 σύμφωνα με τον Πίνακα 22. Πραγματοποιήθηκε η σύγκριση των γονοτύπων 4R-versus 4R+ (Εικόνα 33). Τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια με αυτά των αλληλομόρφων. Τα άτομα που παρουσίαζαν μεγαλύτερη πιθανότητα για το PCOS ήταν τα άτομα που είχαν τουλάχιστον ένα 4 αλληλόμορφο στον γονότυπο. Πιο συγκεκριμένα τα άτομα αυτά είχαν 16% μεγαλύτερη πιθανότητα να εμφανίσουν την ασθένεια. Τα αποτελέσματα όμως και εδώ ήταν **στατιστικά μη σημαντικά** καθώς το p-value ήταν μεγαλύτερο από το 0.05 και το διάστημα εμπιστοσύνης περιείχε την τιμή 1. (Παράρτημα Πινάκας 9). Για τον έλεγχο για τον διαχωρισμό του πληθυσμού κατά φυλές (Παράρτημα Εικόνα 8, Πίνακας 10 )



**Εικόνα 33:** Το forest plot που προκύπτει από την μετα-ανάλυση των αλληλομόρφων 4R- versus 4R+, εκτελώντας την εντολή metan.

Είχαμε **απουσία συστηματικού σφάλματος** δημοσίευσης τόσο για τα αλληλόμορφα όσο και για τους γονότυπους (Πίνακας 22) καθώς πραγματοποιήσαμε έλεγχο με το τεστ του Begg, το τεστ του Egger και με την μέθοδο της μετά-παλινδρόμησης. Αξίζει να σημειώσουμε ότι εντοπίστηκε μεγάλη ποικιλομορφία ανάμεσα στις μελέτες τόσο για τα αλληλόμορφα και για τους γονότυπους καθώς το  $I > 50\%$ . Πιο αναλυτικά τα αποτελέσματα όπου φαίνεται ξεκάθαρα η **παρουσία ετερογένειας** βρίσκονται στον Πίνακα 21, στήλες 6, 7, 8, 9. Στον ίδιο Πίνακα μπορούμε να δούμε και πιο αναλυτικά τα p-value και τα διαστήματα εμπιστοσύνης για την σύγκριση των αλληλομόρφων, των γονοτύπων για όλες τις φυλές μαζί και για κάθε φυλή ξεχωριστά.

Ωστόσο όμως για αρκετές από τις μελέτες είχαμε δεδομένα για τους όλους τους γονότυπους (Πίνακας 23). Με πολυμεταβλητή ανάλυση πραγματοποιήσαμε συγκρίσεις για όλους τους γονότυπους με τον γονότυπο 6/6 καθώς ήταν ο πιο συχνός γονότυπος. Αρχικά υπολογίσαμε τα  $\log(\text{odds ratio})$  με τις παρακάτω εντολές ως εξής:

#### Σύγκριση 4/4 versus 6/6

- `gen b1=log(( g441/ g661)/( g440/g660))`
- `replace b1=log(((0.5+g441)*(0.5+g661))/((0.5+g440)*(0.5+g660)))`  
`if g441==0|g661==0|g440==0|g660==0`

#### Σύγκριση 4/6 versus 6/6

- `gen b2=log(( g461/ g661)/( g460/g660))`
- `replace b2=log(((0.5+g461)*(0.5+g661))/((0.5+g460)*(0.5+g660)))`  
`if g461==0|g661==0|g460==0|g660==0`

#### Σύγκριση 4/8 versus 6/6

- `gen b3=log(( g481/ g661)/( g480/g660))`
- `replace b3=log(((0.5+g481)*(0.5+g661))/((0.5+g480)*(0.5+g660)))`  
`if g481==0|g661==0|g480==0|g660==0`

### Σύγκριση 4/9 versus 6/6

- `gen b4=log(( g491/ g661)/( g490/g660))`
- `replace b4=log(((0.5+g491)*(0.5+g661))/((0.5+g490)*(0.5+g660)))`  
`if g491==0|g661==0|g490==0|g660==0`

### Σύγκριση others versus 6/6

- `gen b9=log(( others1/ g661)/( others0/g660))`
- `replace b9=log(((0.5+others1)*(0.5+g661))/((0.5+others0)*`  
`(0.5+g660))) if others1==0|g661==0|others0==0|g660==0`

Υπολογίζοντας τις διακυμάνσεις και τις συνδιακυμάνσεις έχουμε την δυνατότητα να έχουμε κάποιο συμπέρασμα για τον πιθανό γονότυπο που προκαλεί την εμφάνιση της ασθένειας (Πίνακας 24). Το p-value για όλους τους γονότυπους ήταν μεγαλύτερο του 0.05. Πρέπει να σημειώσουμε το γεγονός ότι τα διαστήματα εμπιστοσύνης σε όλες τις συγκρίσεις δεν περιείχαν το 1, το οποίο αποδεικνύει **στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα**. Επιπλέον, για την μεταβλητή b2 το p-value είναι 0.065 βρίσκεται πολύ κοντά στο 0.05. Το b2, όπως μπορούμε να δούμε από πιο πάνω, αντιπροσωπεύει την σύγκριση του **4/6 versus 6/6**. Το αντίστοιχο logOR όπως παρατηρούμε από τον πίνακα είναι αρνητικό. Δηλαδή το  $\log OR_{b2} = -0.3082638$  άρα ο κίνδυνος ισούνται με  $OR = 0.7347$  γεγονός που σημαίνει ότι υπάρχει μια ισχυρή ένδειξη ότι τα άτομα που έχουν τον γονότυπο 6/6 να έχουν 27% μεγαλύτερη πιθανότητα να αποκτήσουν το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών σε σχέση με τα άτομα που έχουν τον γονότυπο 4/6.

Πίνακας 21: Τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης για τον πολυμορφισμό (TTTTA)η του γονιδίου CYP11a.

Contrast	Race	Number of studies	Odds ratio (random effects)	95% Confidence interval		Cochran's Q	P-value for heterogeneity	I squared	Between studies variance
4R+ allele versus 4R-	All	9	0.852	0.642	1.131	40.96	0.000	80.5%	0.1375
	Caucasian	5	0.825	0.519	1.310	1.17	0.000	89.6%	0.2363
	Asian	3	0.907	0.698	1.180	0.13	0.556	0.0%	0.0000
	Other	1	0.762	0.492	1.179	0.00	.	%.%	0.0000
4R+ genotype versus 4R-	All	9	0.861	0.646	1.149	17.49	0.025	54.3%	0.0972
	Caucasian	5	0.885	0.568	1.378	13.92	0.016	64.1%	0.1802
	Asian	3	0.860	0.514	1.438	2.30	0.129	56.5%	0.0779
	Other	1	0.689	0.392	1.213	0.00	.	%.%	0.0000

Πίνακας 22: Τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης για το publication bias για το τρστ του Begg , του Egger και ο έλεγχος ετερογένειας με meta-regression.

	Test Begg	Test Egger	Meta-regression
4R+ allele versus 4R-	0.348	0.346	0.158
4R+ genotype versus 4R-	0.754	0.346	0.400

**Πίνακας 23: Οι γονότυποι των ασθενών και των υγιών αντίστοιχα. Ως g44 συμβολίζουμε τον γονότυπο 4/4, g46 συμβολίζουμε τον γονότυπο 4/6, g48 συμβολίζουμε τον γονότυπο 4/8, g49 συμβολίζουμε τον γονότυπο 4/9, g66 συμβολίζουμε τον γονότυπο 6/6 και others τους υπόλοιπους γονότυπους.**

	AUTHOR	YEAR	LOCATION	RACE	CASES						CONTROLS							
					g441	g461	g481	g491	g661	Others1	TOTAL1	g440	g460	g480	g490	g660	Others0	TOTAL0
1	Evanthia Diamanti-Kandarakis	2000	Greece	caucasians	25	23	4	7	7	14	80	17	48	5	8	7	5	90
2	Madhavi Pusalkar	2009	India	other	14	23	0	0	52	11	100	16	26	3	1	46	8	100
3	YONG WANG	2006	China	Asians	11	44	3	0	116	27	202	5	41	9	1	66	24	147
4	MICHELLE GAASENBEEK	2004	UK	caucasians	195	150	50	13	29	30	467	426	299	64	38	48	69	944
5	MICHELLE GAASENBEEK	2004	UK	caucasians	91	47	9	23	4	19	193	117	97	23	34	22	43	336
9	Polonca Ferk	2004	Slovenia	caucasians	15	13	8	8	5	9	58	13	21	4	6	2	12	58
10	Cui-Fang Hao	2009	China	Asians	8	38	4	2	57	15	124	8	34	6	0	55	18	121

Πίνακας 24: Τα αποτελέσματα για τον έλεγχο των γονοτύπων. Το b2 αντιστοιχεί στη σύγκριση του γονοτύπου 4/6 έναντι 6/6.

Log likelihood = -28.147897						Number of obs = 7
						Wald chi2(5) = 6.61
						Prob > chi2 = 0.2510
	Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]	
Overall_mean						
b1	.0568532	.1820562	0.31	0.755	-.2999704	.4136767
<b>b2  </b>	<b>-.3082638</b>	<b>.1672876</b>	<b>-1.84</b>	<b>0.065</b>	<b>-.6361414</b>	<b>.0196138</b>
b3	-.2943183	.2917089	-1.01	0.313	-.8660573	.2774207
b4	-.1341466	.250389	-0.54	0.592	-.6248999	.3566068
b9	-.1995903	.1682417	-1.19	0.235	-.529338	.1301574

## ΕΛΕΓΧΟΣ T-TEST

Τα αποτελέσματα από το t-test έδειξαν μια στατιστικά σημαντική συσχέτιση της ηλικίας ασθενών σε σχέση με τους υγιείς. Για τα υπολοιπα βιοχημικά χαρακτηριστικά δεν εντοπίσαμε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα.

Paired t test							
Variable		Obs	Mean	Std.Err.	Std.Dev.	[95% Conf.Interval]	
age1		7	29.2	1.648665	4.361957	25.16586	33.23414
age0		7	32.7	1.269045	3.357578	29.59476	35.80524
diff		7	-3.5	1.356817	3.589801	-6.820012	-.1799879
mean(diff) = mean(age1 - age0)						t = -2.5796	
Ho: mean(diff) = 0				degrees of freedom = 6			
Ha: mean(diff) < 0		Ha: mean(diff) != 0		Ha: mean(diff) > 0			
Pr(T < t) = 0.0209		Pr( T  >  t ) = 0.0418		Pr(T > t) = 0.9791			

**Πίνακας 25:** Τα αποτελέσματα για τον έλεγχο του t-test των μέσων τιμών της ηλικίας.

## ΕΛΕΓΧΟΣ ΜΕΤΑ-ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗΣ

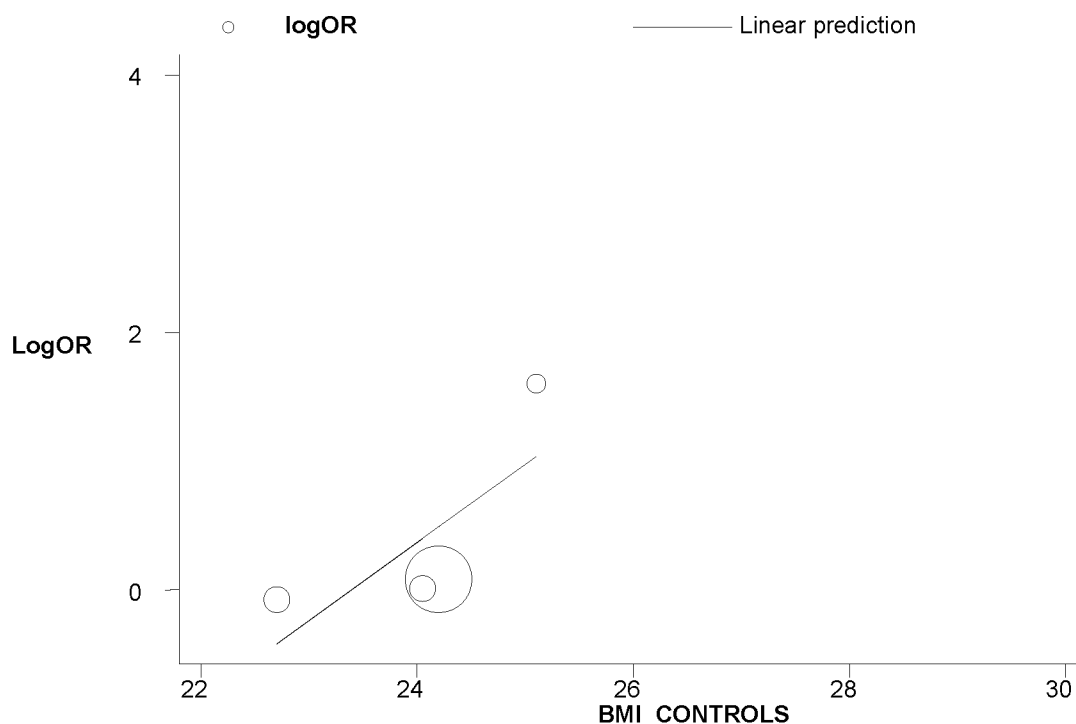
Με μετα-παλινδρόμηση ελέγξαμε αν ο αυξημένος κίνδυνος για τα αλληλόμορφα 4R- προέρχεται από τα βιοχημικά χαρακτηριστικά και αυτά με την σειρά τους προκαλούν το PCOS. Ελέγχαμε ωστόσο τόσο για τον κίνδυνο των αλληλομόρφων όσο και των γονοτύπων ξεχωριστά. Τα βιοχημικά χαρακτηριστικά των υγιών και των ασθενών φαίνονται στον Πίνακα 26. Όπως βλέπουμε στον Πίνακα δεν περιείχαν όλες οι μελέτες δεδομένα για τα χαρακτηριστικά των δειγμάτων.

Πίνακας 26: Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών και υγιών αντίστοιχα.

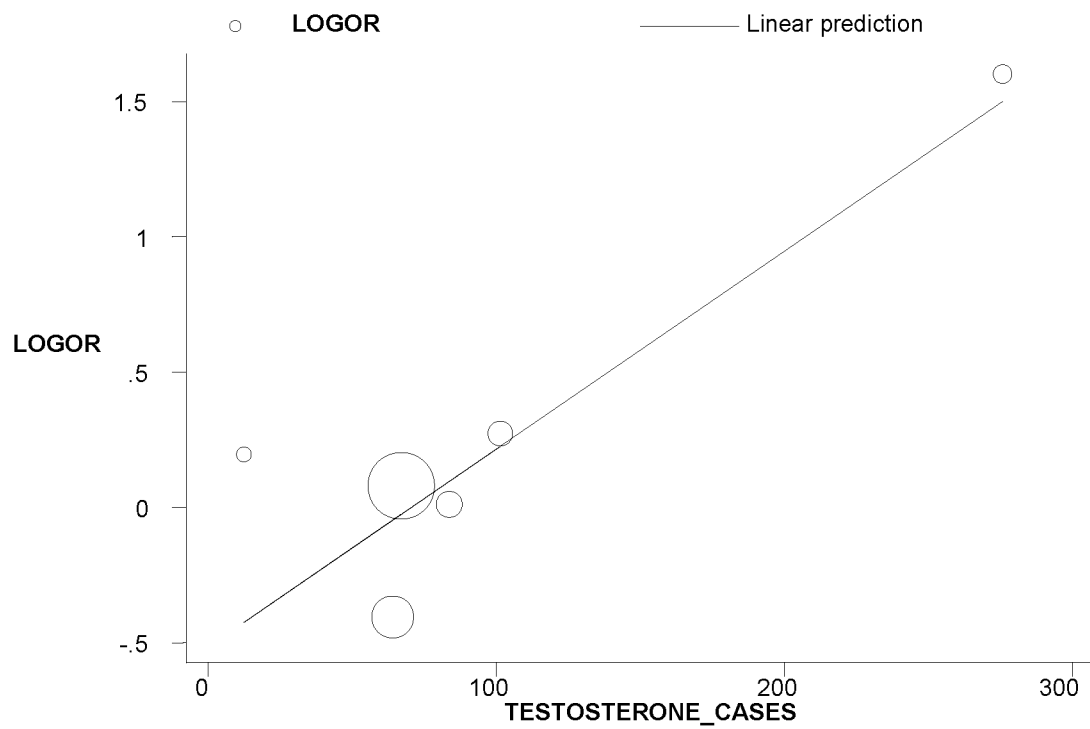
AUTHOR	YEAR	LOCATION	RACE	CASES					CONTROLS				
				t1	Age1	bmi1	WHR1	TOTAL1	t0	age0	bmi0	WHR0	TOTAL0
Evanthia Diamanti-Kandarakis	2000	Greece	caucasians	83.78	24.5	26.68	0.76	80	38.83	33.2	24.05	0.73	90
Madhavi Pusalkar	2009	India	other	101.4				100	58.63				100
YONG WANG	2006	China	Asians		26.1			202		29.1			147
MICHELLE GAASENBEEK	2004	UK	caucasians	67	31	25.2	0.82	467	59	31	24.2	0.81	944
MICHELLE GAASENBEEK	2004	UK	caucasians	64	33.8	27.4	0.80	193		38.6			336
Jose' L. San Milla' n	2001	Spain	caucasians	67.4	23.8	27.3		34	42.2	31.1	29.43		33
Neda Gharani	1996	Australia	caucasians	80.76				97	56.24				110
Sai'd Daneshmand	2002	California	caucasians	275.6	34.3	28.7		51	46.1	35.6	25.1		280
Cui-Fang HAO	2009	China	Asians		30.9	25.3	0.82	124		30.3	22.7	0.77	121
Maria s. Perez	2008	Argentina	Asians	12.5				64	10				57



Η ανάλυση **μετα-παλινδρόμησης** για τον κίνδυνο των **αλληλομόρφων** έδειξε μια στατιστικά ασθενής συσχέτιση με το δείκτη μάζας σώματος των υγιών ( $p=0.092$ ) (Εικόνα 36) και μια σημαντική συσχέτιση της ασθένειας με την ολική τεστοστερόνη των ασθενών ( $p=0.000$ ) (Εικόνα 37) (Παράρτημα Πίνακας 45, Πίνακας 48). Ενδιαφέρον είναι να επισημάνουμε ότι ο δείκτης μάζας σώματος των υγιών για την **φυλή των Καυκάσιων** παρουσίασε μια **στατιστικά σημαντική συσχέτιση** με τον κίνδυνο των αλληλομόρφων 4R- (Παράρτημα Εικόνα 29, Πίνακας 52). Ιδιαίτερη προσοχή αξίζει να δώσουμε στο γεγονός ότι η συσχέτιση για την τεστοστερόνη βρέθηκε στους ασθενείς. Η ισχυρή συσχέτιση πιθανώς να παρουσιάστηκε λόγω συμπτώματος, καθώς στους υγιείς δεν βρέθηκε κάποια ένδειξη. Άρα η συσχέτιση για την τεστοστερόνη δεν είναι πλήρως αξιολογήσιμη.



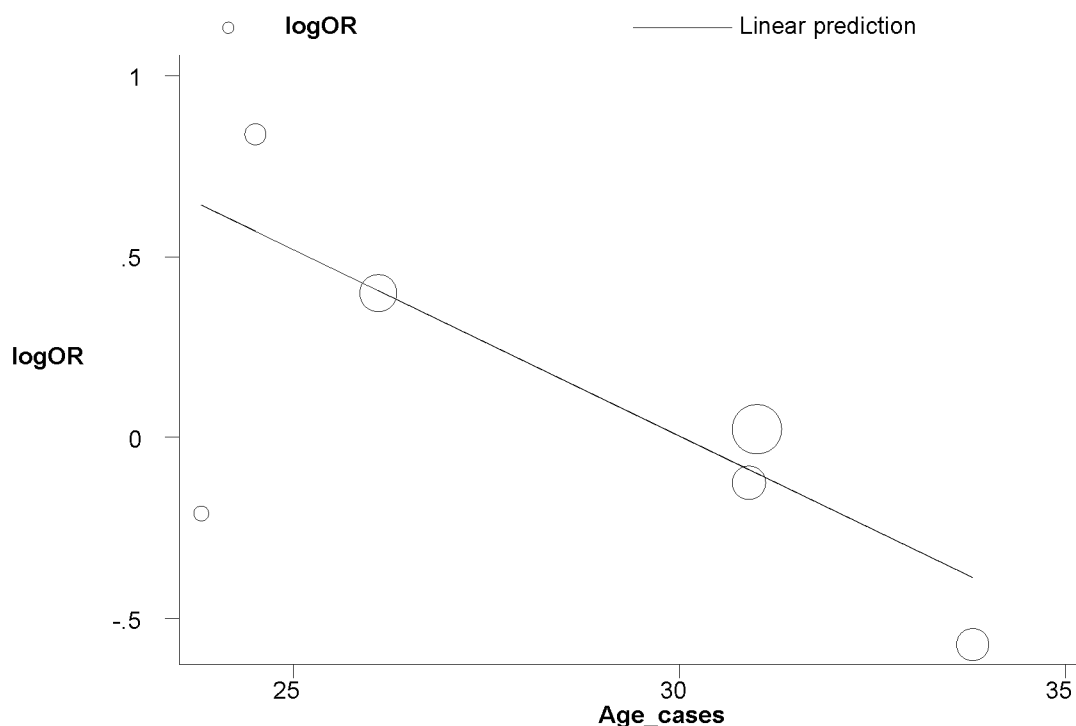
**Εικόνα 36:** Το διάγραμμα που παράγεται από το metaregression για το δείκτη μάζας σώματος των υγιών. Στον κάθετο άξονα εμφανίζεται το log(odds ratio) των αλληλομόρφων του γονιδίου CYP11a και στον οριζόντιο ο δείκτης μάζας σώματος των υγιών.



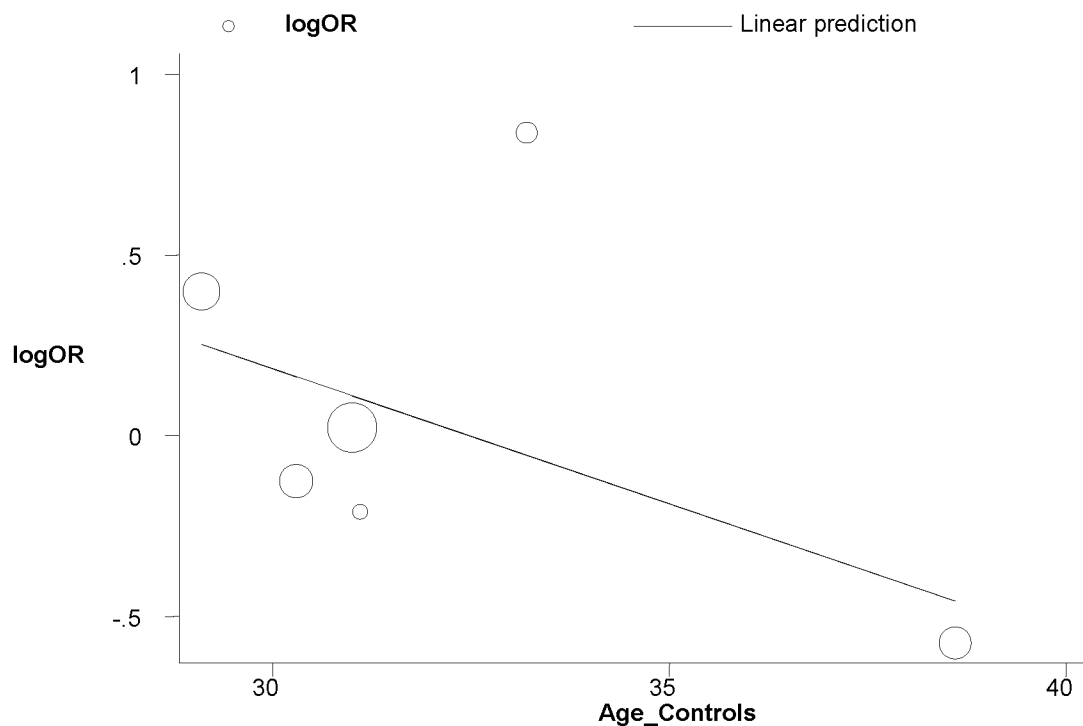
**Εικόνα 37:** Το διάγραμμα που παράγεται από το metaregression της ολικής τεστοστερόνης των ασθενών. Στον κάθετο άξονα εμφανίζεται το log(odds ratio) των αλληλομόρφων του γονιδίου CYP11a και στον οριζόντιο η ολική τεστοστερόνη των ασθενών.

Η ανάλυση **μετά-παλινδρόμησης** για τον κίνδυνο των **γονοτύπων** έδειξε μια στατιστικά σημαντική συσχέτιση της ασθένειας με την ηλικία των ασθενών ( $p=0.003$ ) (Εικόνα 38), μια ασθενέστερη συσχέτιση με την ηλικία των υγιών ( $p=0.066$ ) (Εικόνα 39) και με την ολική τεστοστερόνη των ασθενών ( $p=0.083$ ) (Εικόνα 40).

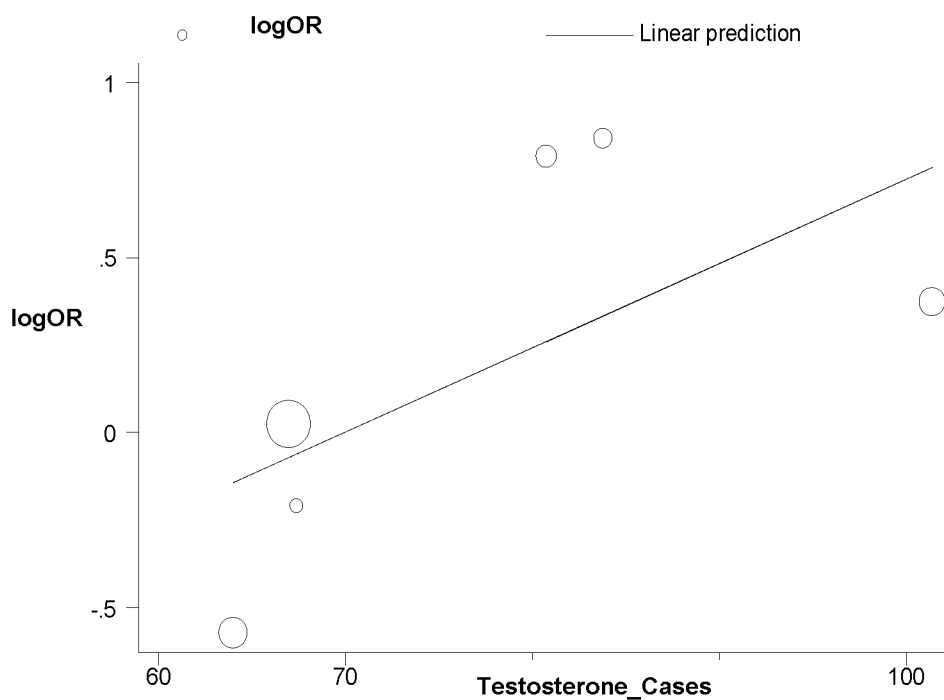
Όπως αναφέραμε και προηγουμένως που ελέγχουμε για τον κίνδυνο των αλληλομόρφων οι συσχετίσεις που βρέθηκαν στα βιοχημικά χαρακτηριστικά των ασθενών δεν είναι πλήρως αξιολογήσιμες καθώς δεν γνωρίζουμε αν για παράδειγμα τα αυξημένα επίπεδα τεστοστερόνης οδήγησαν στο PCOS ή αν το PCOS προκάλεσε τα αυξημένα επίπεδα.



**Εικόνα 38:** Το διάγραμμα που παράγεται από το **metaregression** της ηλικίας των ασθενών. Στον κάθετο άξονα εμφανίζεται το **log(odds ratio)** των γονοτύπων του γονιδίου **CYP11a** και στον οριζόντιο η ηλικία των ασθενών.



**Εικόνα 39:** Το forest plot που παράγεται από το metaregression της ηλικίας των υγιών. Στον κάθετο άξονα εμφανίζεται το log(odds ratio) των γονοτύπων του γονιδίου CYP11a και στον οριζόντιο η ηλικία των υγιών.



**Εικόνα 39:** Το forest plot που παράγεται από το metaregression της τεστοστερόνης των ασθενών. Στον κάθετο άξονα εμφανίζεται το log(odds ratio) των γονοτύπων του γονιδίου CYP11a και στον οριζόντιο η τεστοστερόνη των ασθενών.

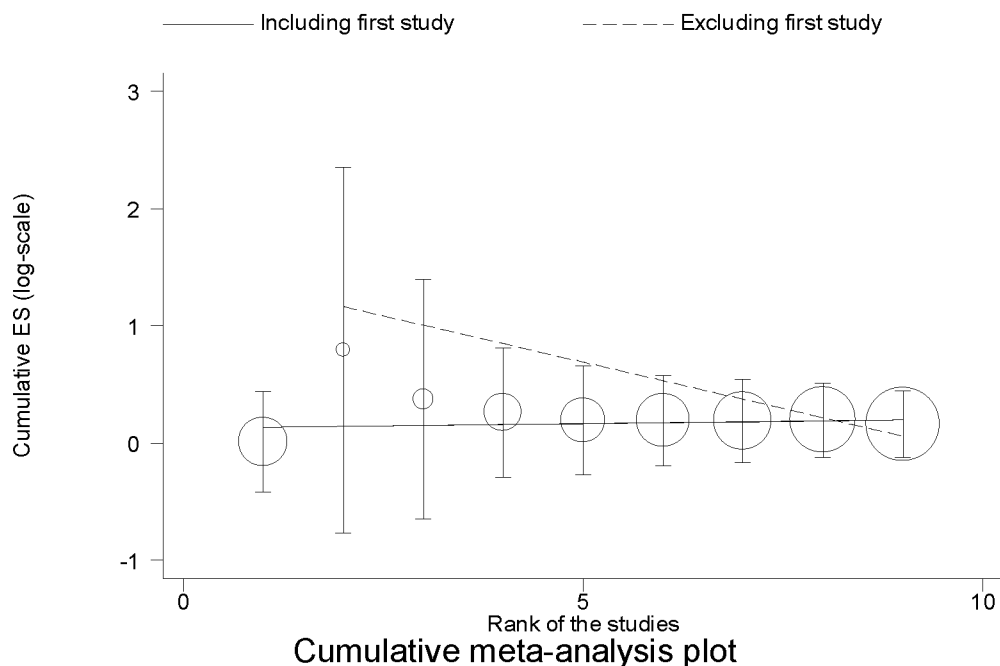
Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι **στατιστικά σημαντική συσχέτιση βρέθηκε μόνο για το δείκτη μάζας σώματος των υγιών στη φυλή των Καυκάσιων με τον κίνδυνο των αλληλομόρφων.**

## ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΤΟΥ ΠΡΩΤΕΑ

Το φαινόμενο του Πρωτέα **ήταν εμφανές στα αλληλόμορφα** όταν αφαιρούσαμε την πρώτη μελέτη, ενώ δεν υπήρχε διαχρονική τάση για όλες τις μελέτες συνολικά. (Πίνακας 22, Εικόνα 34). Το αποτέλεσμα αυτό πιθανώς, όπως μπορούμε να δούμε και από το διάγραμμα, λόγω του γεγονότος ότι η δεύτερη μελέτη παρουσίασε ένα πολύ υψηλό κίνδυνο. Κατόπιν, όμως επειδή ο αριθμός των μελετών αυξήθηκε το βάρος της δεύτερης μελέτης μειώθηκε με αποτέλεσμα όλες μαζί οι μελέτες να μην παρουσιάζουν το φαινόμενο του Πρωτέα.

Tests for detecting trends in cumulative meta-analysis						
Number of studies: 9						
'First vs. Subsequent' method						
	Effect Size (ES)	P-value	[95% Conf. Interval]			
First study	1.0112	0.959	0.6601	1.5491		
Subsequent studies	1.2013	0.257	0.8750	1.6492		
All Studies	1.1733	0.268	0.8843	1.5568		
Test for the equality of the ESs						
Ho: ES(first) = ES(subsequent)						
z-value = -0.635						
<b><u>P-value = 0.525</u></b>						
Generalized Least Squares (GLS) Regression-based test						
	Coef.	Std. Err.	P-value	[95% Conf. Interval]		rho
Including all studies	0.00764	0.01132	0.500	-0.01455	0.02983	0.031
<b><u>Excluding first study</u></b>	-0.15785	0.04237	<b>0.000</b>	-0.24090	-0.07480	0.334

**Πίνακας 12: Τα αποτελέσματα για τον για τον έλεγχο του φαινομένου του Πρωτέα για τα αλληλόμορφα του γονιδίου CYP11a (4R- versus 4R+)**

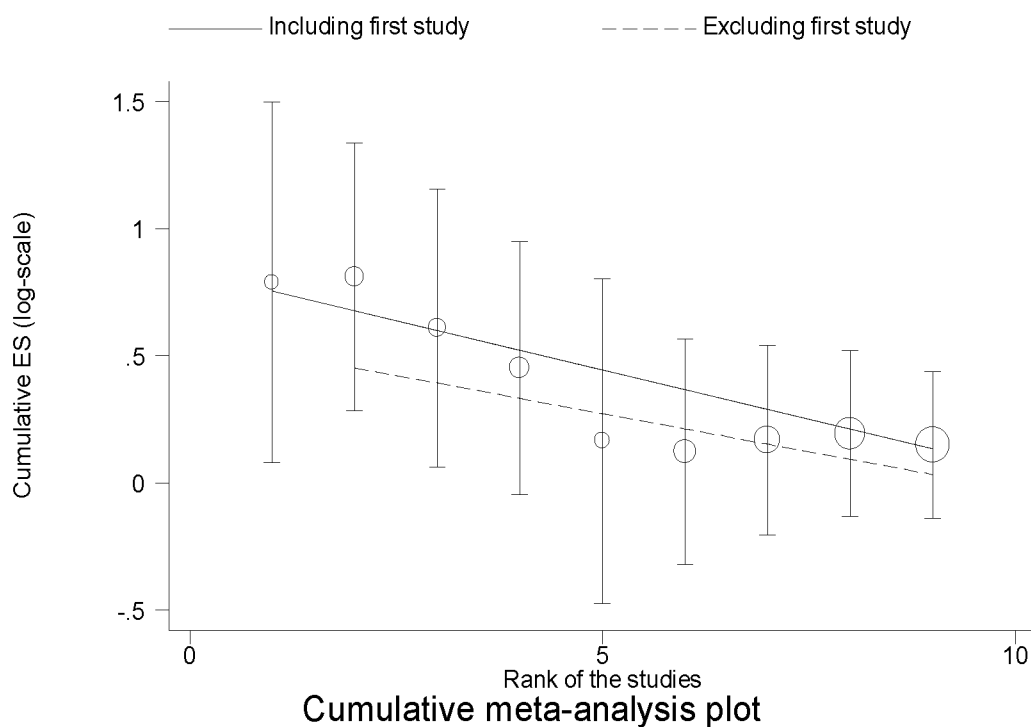


**Εικόνα 34: Ο έλεγχος για το φαινόμενο του Πρωτέα για την σύγκριση των αλληλομόρφων 4R- versus 4R+.**

Όσο αφορά τους **γονότυπους** το φαινόμενο του **Πρωτέα** ήταν **εμφανές** ακόμη και όταν αφαιρούσαμε την πρώτη μελέτη (Εικόνα 35). Αυτό μπορούμε να το δούμε από τον Πίνακα 23 που το p-value για την αθροιστική μετά-ανάλυση βρίσκεται πολύ κοντά στο 0.05 και από τον έλεγχο της μετά-παλινδρόμησης που το p-value είναι μικρότερο από το 0.05.

Tests for detecting trends in cumulative meta-analysis						
Number of studies: 9						
'First vs. Subsequent' method						
	Effect Size (ES)	P-value	[95% Conf. Interval]			
First study	2.1991	0.030	1.0816	4.4712		
Subsequent studies	1.0838	0.578	0.8165	1.4387		
All Studies	1.1610	0.310	0.8704	1.5488		
Test for the equality of the ESs						
Ho: ES(first) = ES(subsequent)						
z-value =	1.815					
<b>P-value =</b>	<b>0.070</b>					
Generalized Least Squares (GLS) Regression-based test						
	Coef.	Std. Err.	P-value	[95% Conf. Interval]		rho
<b><u>Including all studies</u></b>	-0.07763	0.01917	<b><u>0.000</u></b>	-0.11521	-0.04005	0.651
Excluding first study	-0.05991	0.02791	0.032	-0.11461	-0.00521	0.383

**Πίνακας 23: Τα αποτελέσματα για τον για τον έλεγχο του φαινομένου του Πρωτέα για τους γονότυπους του γονιδίου CYP11a (4R- versus 4R+)**



**Εικόνα 35: Ο έλεγχος για το φαινόμενο του Πρωτέα για την σύγκριση των γονοτύπων 4R- versus 4R+.**

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4:**

## **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ –ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PolyCystic Ovarian Syndrome – PCOS) είναι η πιο συχνή ανωμαλία της λειτουργίας των ωοθηκών και η πιο συχνή ενδοκρινοπάθεια. Ένα ποσοστό 6% -7% όλων των γυναικών παρουσιάζει το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών κυρίως στην αναπαραγωγική ηλικία (Diamanti-Kandarakis et al. 1999; Azziz et al. 2004)(Asuncion et al. 2000). Η μεγάλη ετερογένεια και τα πολλαπλά συμπτώματα που έχουν παρουσιάσει οι ασθενείς έχουν τραβήξει το ενδιαφέρον πολλών επιστημόνων. Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές έρευνες με σκοπό να εξετάσουν την πιθανότητα συσχέτισης κάποιου γονιδίου με την ασθένεια του συνδρόμου των πολυκυστικών ωοθηκών μιας και υπάρχουν αρκετές περιπτώσεις που το σύνδρομο εμφανίζεται μέσα σε οικογένειες (Alcoser et al. 2004; Barber et al. 2007; Jones et al. 2007).

Η παρούσα μετα-ανάλυση είναι η πρώτη που μελετά την πιθανή συσχέτιση του πολυμορφισμού (TAAAA)<sub>n</sub> στον υποκινητή του γονιδίου SHBG και του πολυμορφισμού (TTTTA)<sub>n</sub> στον υποκινητή του γονιδίου CYP11a με το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών.

Μια συστηματική ανασκόπηση της βιβλιογραφίας πραγματοποιήθηκε πριν την μετα-ανάλυση. Στη μετα-ανάλυση χρησιμοποιήσαμε μοντέλα τυχαίων επιδράσεων και επιλέξαμε ως μέγεθος επίδρασης το odds ratio καθώς τα δεδομένα μας ήταν διακριτά. Από το σύνολο των 57 μελετών, 15 μελέτες συμπεριλήφθησαν στη μετα-ανάλυση με σύνολο 3041 υγιών και 2122 ασθενών. Οι υπόλοιπες 42 μελέτες απορρίφθηκαν καθώς είτε αναφέρονταν σε άλλα γονίδια είτε ήταν μελέτες in vitro, σε ποντίκια είτε δεν αναφέρονταν στο σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών. Αλλά εμφανίστηκαν αρκετοί πολυμορφισμοί κατά την διάρκεια της μελέτης, αλλά μόνο για τον πολυμορφισμό (TAAAA)<sub>n</sub> του γονιδίου SHBG και για τον πολυμορφισμό (TTTTA)<sub>n</sub> του γονιδίου CYP11a είχαμε αρκετά δεδομένα.

Για το γονίδιο **SHBG** βρήκαμε μια **στατιστικά σημαντική συσχέτιση** με το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών. Η σύγκριση των αλληλομόρφων L versus S είχε έναν κίνδυνο 1.26 (1.05 - 1.500). Η σύγκριση LL versus SL+SS (υπολειπόμενο μοντέλο) ένα κίνδυνο 1.31 ( 1.03 - 1.67) και η σύγκριση LL+SL versus SS είχε ένα κίνδυνο 1.35 (1.06 - 1.73). Καθώς τα στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα και για τις τρεις συγκρίσεις δεν μας αφήνουν περιθώριο να διαχωρίσουμε το γενετικό μοντέλο



κληρονομικότητας του πολυμορφισμού, ελέγξαμε τον μοντέλο κληρονομικότητας της νόσου μέσω του πολυμορφισμού του γονιδίου SHBG με πολυμεταβλητή ανάλυση. Από τους υπολογισμούς που κάναμε θεωρούμε ότι ο τρόπος κληρονομικότητας είναι **συνεπικρατής** ( $\lambda=0.461\sim0.5$ ). Δεδομένου, λοιπόν, ότι το γονίδιο είναι συνεπικρατές, δίνουμε μεγαλύτερη βαρύτητα στη σύγκριση των αλληλομόρφων (L versus S) με κίνδυνο 1.26 (1.05 1.50). Δηλαδή τα άτομα που είχαν το αλληλόμορφο L είχαν 26% περισσότερη πιθανότητα να εκφράσουν την ασθένεια και τα άτομα που είχαν τα αλληλόμορφα LL είχαν 52% περισσότερη πιθανότητα να νοσήσουν. Αξίζει να σημειώσουμε ότι με τα παραπάνω ποσοστά ο **επιπολασμός** του σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών **διαφοροποιείται**. Τα άτομα με ένα L αλληλόμορφο έχουν 26% μεγαλύτερη πιθανότητα να αποκτήσουν την ασθένεια άρα ο επιπολασμός πλησιάζει το 9% και όχι το 7%. Αντίστοιχα ο επιπολασμός πλησιάζει το 10% για τα άτομα που έχουν δύο L αλληλόμορφα ( ποσοστό 52%).

Και για τους τρεις ελέγχους που πραγματοποιήθηκαν η **ετερογένεια** είναι **μικρή** ( $I^2<25\%$ ), γεγονός που δηλώνει ότι δεν υπάρχει μεγάλη ποικιλομορφία μεταξύ των μελετών. Είχαμε **απουσία συστηματικού σφάλματος δημοσίευσης**. Οι έλεγχοι και για τα τρία τεστ (τεστ του Begg, τεστ του Egger, μετά-παλινδρόμηση) είχαν ένα p-value μεγαλύτερο από 0.05. Ο έλεγχος για την ισορροπία Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) δεν ήταν δυνατόν να πραγματοποιηθεί καθώς ήταν απαραίτητο η ύπαρξη δεδομένων για κάθε αλληλόμορφο ξεχωριστά, και οι μελέτες δεν παρείχαν πλήρη δεδομένα.

Η πρώτη μελέτη το 2003 (Xita et al. 2003) παρουσίασε έναν πολύ υψηλό κίνδυνο (1.56) σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες. Ο αυξημένος αυτός κίνδυνος (1.56) τράβηξε ιδιαίτερα το ενδιαφέρον των επιστημόνων για την περεταίρω μελέτη αυτού του γονιδίου, προσπαθώντας να αποδείξουν την συσχέτιση του γονιδίου SHBG με το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών. Λόγω όμως αυτού του αυξημένου κινδύνου **το φαινόμενο του Πρωτέα ήταν εμφανές**. Η ένδειξη διαχρονικής τάσης δηλώνει ότι το αποτέλεσμα να είναι **υπερεκτιμημένο** λόγω της πρώτης μελέτης, αν και πρέπει να επισημάνουμε κάποια σημαντικά θέματα. Η διαχρονική τάση μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η πρώτη μελέτη που παρουσίασε τον τόσο υψηλό κίνδυνο, χρησιμοποιούσε έναν διαφορετικό τρόπο κατηγοριοποίησης για τα αλληλόμορφα Short(S), Long(L), καθώς τοποθετούσε κάποιους γονότυπους που συμπεριλάμβαναν το αλληλόμορφο S στους Short και κάποιους άλλους στους Long.

Σημαντικός είναι ο έλεγχος που κάναμε για την εκτίμηση του βαθμού συσχέτισης των βιοχημικών χαρακτηριστικών με τον κίνδυνο για νόσο από τα αλληλόμορφα L. Βρήκαμε μια ασθενή συσχέτιση στα αλληλόμορφα των υγιών του γονιδίου SHBG με το δείκτη μάζας σώματος (BMI), την ολική τεστοστερόνη (T) και τον λόγο της ωχρινोटρόπου προς την θυλακιοτρόπο ορμόνη (LH/FSH). Τα αποτελέσματα για τον έλεγχο της πρωτεΐνης SHBG με τον κίνδυνο των αλληλομόρφων ήταν στατιστικά μη σημαντικά πιθανώς λόγω των λίγων μελετών που υπήρχαν. Σημαντικό είναι ότι οι κλίσεις όλων των ευθειών είναι αντίθετες από αυτές που αναμένονται σε τέτοιου είδους μελέτες.

Πιθανολογήσαμε σύμφωνα με το διάγραμμα 2 ότι όταν ο κίνδυνος για τον έναν πολυμορφισμό ((TAAAA)<sub>n</sub>) αυξάνεται, για κάποιον δείκτη M μειώνεται. Αυτό σημαίνει ότι **ο πολυμορφισμός (TAAAA)<sub>n</sub> βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης πιθανώς με κάποιον άλλο πολυμορφισμό στο γονίδιο SHBG.**

Πράγματι, μερικές μελέτες (Cousin et al. 2004; Bendlova et al. 2007; Ferk et al. 2007) έχουν δείξει ότι ο πολυμορφισμός (TAAAA)<sub>n</sub> του γονιδίου SHBG βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης με τον πολυμορφισμό D327N που βρίσκεται το εξώνιο 8 στο γονίδιο SHBG. Τέλος, πρέπει να αναφέρουμε ότι πρέπει να είμαστε επιφυλακτικοί απέναντι σε αυτά τα αποτελέσματα καθώς ο αριθμός των μελετών ήταν πολύ μικρός (3 μελέτες) και είναι υπαρκτή η πιθανότητα για σφάλμα τύπου 2.

*Για όλους τους παραπάνω λόγους περισσότερες μελέτες φαίνεται ότι είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν με σκοπό την περεταίρω διερεύνηση της συσχέτισης πολυμορφισμού του γονιδίου SHBG (TAAAA ή με τον πολυμορφισμό που πιθανώς βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης με τον TAAAA, τον D327N) με το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών.*

Μελετήσαμε τη συσχέτιση για PCOS με τον πολυμορφισμό (TTTTA)<sub>n</sub> του γονιδίου CYP11a. Βρήκαμε **στατιστικά μη σημαντικά ευρήματα** τόσο για τους γονότυπους όσο και τα αλληλόμορφα 4R- versus 4R+.

Σε κάθε περίπτωση της προηγούμενης ανάλυσης βρέθηκε **στατιστικά σημαντική ετερογένεια** ( $I^2 > 50\%$ ). Επίσης, δεν βρέθηκε **στατιστικά σημαντικό σφάλμα δημοσίευσης** με τον έλεγχο του Begg, του Egger και τον έλεγχο της μετα-παλινδρόμησης.

Μερικές μελέτες περιείχαν δεδομένα για όλους τους γονότυπους. Ελέγξαμε τον πιθανό γονότυπο που προκαλεί τον κίνδυνο για το PCOS. Βρήκαμε **ισχυρή ένδειξη** για την σύγκριση του γονοτύπου 4/6 versus 6/6 ( $p=0.065$ ) με το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών. Ο σχετικός κίνδυνος που υπολογίστηκε είναι 0.73 που δείχνει ότι στα άτομα που έχουν τον **γονότυπο 6/6** έχουν 27% μεγαλύτερη πιθανότητα σε σχέση με αυτά που έχουν τον γονότυπο 4/6 να εμφανίσουν το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών.

Το **φαινόμενο του Πρωτέα** είναι **εμφανές** για τους γονότυπους ακόμη και όταν αφαιρούμε την πρώτη μελέτη ενώ για τα αλληλόμορφα είναι εμφανές όταν δεν αφαιρούμε την πρώτη μελέτη. Τα αποτελέσματα αυτά είναι αρκετά περίπλοκα. Σημειώνουμε το γεγονός ότι κάποιες μελέτες που χρησιμοποιήθηκαν στη σύγκριση των αλληλομόρφων δεν χρησιμοποιήθηκαν στη σύγκριση των γονοτύπων και αντίστροφα. Πιθανώς λοιπόν τα περίεργα αυτά αποτελέσματα να οφείλονται στην ανυπαρξία ισοροπίας Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) σε κάποια από τις μελέτες. Όμως τα δεδομένα δεν ήταν αρκετά για να ελέγξουμε αν όντως υπάρχει ανισοροπία HWE. Τα αντιφατικά αποτελέσματα και το φαινόμενο του Πρωτέα δηλώνουν ότι το αποτέλεσμα είναι επίσης **υπερεκτιμημένο λόγω των πρώτων μελετών** που πραγματοποιήθηκαν.

*Σε άλλες μετα-αναλύσεις 11 μελέτες αρκούν για να δείξουν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα. Στην δική μας περίπτωση όμως οι 11 μελέτες που χρησιμοποιήθηκαν δεν ήταν αρκετές. Εφόσον, λοιπόν, με τις 11 μελέτες δεν βρέθηκε ουσιαστικά στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το 4R- και το ασθενές στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα που βρήκαμε (για τον γονότυπο 6/6 σε σχέση με τον γονότυπο 4/6) είναι υπερεκτιμημένο (εμφανές το φαινόμενο του Πρωτέα), λίγες μελέτες παραπάνω πιθανώς να μην εμφάνιζαν κάποιο διαφορετικό, στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα. Είναι σημαντικό όμως να αναφέρουμε ότι σύμφωνα με έναν έλεγχο που κάναμε (Barrowman et al. 2003) για να αποδειχθεί με ακρίβεια η στατιστικά σημαντική ή η στατιστικά μη σημαντική συσχέτιση με το PCOS απαιτούνται 313093 άτομα ακόμη για έρευνα.*

Αυτό ίσως που θα είχε ενδιαφέρον για τον πολυμορφισμό αυτόν είναι το εξής: Η στατιστικά σημαντική συσχέτιση του δείκτη μάζας σώματος της φυλής των υγιών Καυκάσιων με τον κίνδυνο του αλληλομόρφου 4R- ( $p=0.000$ ) ίσως πρέπει να παρακινήσει τους επιστήμονες να μελετήσουν ειδικά το δείκτη μάζας σώματος στην

φυλή των Καυκάσιων με τον κίνδυνο για PCOS που οφείλεται στον πολυμορφισμό (TTTAA)<sub>n</sub>.

Η μετα-ανάλυση των δύο αυτών πολυμορφισμών των γονιδίων SHBG και CYP11a μας έδωσε την δυνατότητα να παρατηρήσουμε ορισμένες ομοιότητες ανάμεσα στους δύο αυτούς πολυμορφισμούς. Και οι δύο πολυμορφισμοί βρίσκονται στους υποκινητές των γονιδίων, έχουν επαναλήψεις πεντανουκλεοτιδίων και είναι πλούσιοι σε T και A. Πιθανώς, λοιπόν, να υπάρχει κάποια συσχέτιση με την ποσότητα της εκφραζόμενης πρωτεΐνη κάθε γονιδίου. Είναι πιθανόν μια προσθήκη ή μια έλλειψη να αλλάζε τη δύναμη πρόσδεσης των νουκλεοσωμάτων στον υποκινητή και τον τρόπο που αυτός καθορίζει τον τρόπο μεταγραφής των γονιδίων. Για τον λόγο αυτό, πειράματα προς αυτή την κατεύθυνση απαιτούνται για να εξακριβωθεί ο μηχανισμός με τον οποίο οι συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί (αριθμός επαναλήψεων) σχετίζονται με το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών (Segal et al. 2006; Huda et al. 2009; Tirosh et al. 2009).

Επιπλέον, **μελλοντικές έρευνες** κρίνεται απαραίτητο να πραγματοποιηθούν με σκοπό την περαιτέρω διερεύνηση πολυγονιδιακής συσχέτισης με το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών, που θα ενισχύσουν ή θα απορρίψουν τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας. Σημαντική θα ήταν η έρευνα της συσχέτισης του συνδρόμου των πολυκυστικών ωοθηκών για κάθε γονότυπο ξεχωριστά με συνεχή δεδομένα, όπως για παράδειγμα με τα διάφορα βιοχημικά χαρακτηριστικά των ασθενών, όπως τεστοστερόνη και τα επίπεδα της πρωτεΐνης SHBG. Στην παρούσα πτυχιακή λόγω έλλειψης δεδομένων για τα διάφορα βιοχημικά χαρακτηριστικά, η συσχέτιση του συνδρόμου των πολυκυστικών ωοθηκών με συνεχή δεδομένα και η πραγματοποίηση αυτού του είδους μετα-ανάλυσης ήταν αδύνατη.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- Abbott, D. H., D. K. Barnett, et al. (2005). "Androgen excess fetal programming of female reproduction: a developmental aetiology for polycystic ovary syndrome?" Hum Reprod Update **11**(4): 357-74.
- Abbott, D. H., D. A. Dumesic, et al. (2002). "Developmental origin of polycystic ovary syndrome - a hypothesis." J Endocrinol **174**(1): 1-5.
- Alcoser, S. Y., M. Hara, et al. (2004). "Association of the (AU)AT-rich element polymorphism in PPP1R3 with hormonal and metabolic features of polycystic ovary syndrome." J Clin Endocrinol Metab **89**(6): 2973-6.
- Anderson, D. C. (1974). "Sex-hormone-binding globulin." Clin Endocrinol (Oxf) **3**(1): 69-96.
- Asuncion, M., R. M. Calvo, et al. (2000). "A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain." J Clin Endocrinol Metab **85**(7): 2434-8.
- Awad, M. "Publication bias in clinical trials." J Can Dent Assoc **76**: a175.
- Azziz, R., K. S. Woods, et al. (2004). "The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population." J Clin Endocrinol Metab **89**(6): 2745-9.
- Bagos, P. G. (2008). "A unification of multivariate methods for meta-analysis of genetic association studies." Stat Appl Genet Mol Biol **7**(1): Article31.
- Bagos, P. G. and G. K. Nikolopoulos (2007). "A method for meta-analysis of case-control genetic association studies using logistic regression." Stat Appl Genet Mol Biol **6**: Article17.
- Bagos, P. G. and G. K. Nikolopoulos (2009). "Generalized least squares for assessing trends in cumulative meta-analysis with applications in genetic epidemiology." J Clin Epidemiol **62**(10): 1037-44.
- Balen, A. and K. Michelmores (2002). "What is polycystic ovary syndrome? Are national views important?" Hum Reprod **17**(9): 2219-27.
- Balen, A. H., G. S. Conway, et al. (1995). "Polycystic ovary syndrome: the spectrum of the disorder in 1741 patients." Hum Reprod **10**(8): 2107-11.
- Balen, A. H., J. S. Laven, et al. (2003). "Ultrasound assessment of the polycystic ovary: international consensus definitions." Hum Reprod Update **9**(6): 505-14.

- Barber, T. M., A. J. Bennett, et al. (2007). "Relationship between E23K (an established type II diabetes-susceptibility variant within KCNJ11), polycystic ovary syndrome and androgen levels." Eur J Hum Genet **15**(6): 679-84.
- Barrowman, N. J., M. Fang, et al. (2003). "Identifying null meta-analyses that are ripe for updating." BMC Med Res Methodol **3**: 13.
- Baynes, D. Biochemistry of Endocrinology. Medical Biochemistry. P. A.E.
- Bendlova, B., J. Zavadilova, et al. (2007). "Role of D327N sex hormone-binding globulin gene polymorphism in the pathogenesis of polycystic ovary syndrome." J Steroid Biochem Mol Biol **104**(1-2): 68-74.
- Berube, D., G. E. Seralini, et al. (1990). "Localization of the human sex hormone-binding globulin gene (SHBG) to the short arm of chromosome 17 (17p12----p13)." Cytogenet Cell Genet **54**(1-2): 65-7.
- Bland, J. M. and D. G. Altman (2000). "Statistics notes. The odds ratio." BMJ **320**(7247): 1468.
- Burghen, G. A., J. R. Givens, et al. (1980). "Correlation of hyperandrogenism with hyperinsulinism in polycystic ovarian disease." J Clin Endocrinol Metab **50**(1): 113-6.
- Burton, R. M. and U. Westphal (1972). "Steroid hormone-binding proteins in blood plasma." Metabolism **21**(3): 253-76.
- Carlin, J. B. (2000). "Tutorial in biostatistics. Meta-analysis: formulating, evaluating, combining, and reporting by S-L. T. Normand, Statistics in Medicine, 18, 321-359 (1999)." Stat Med **19**(5): 753-9.
- Chen, X., D. Yang, et al. (2008). "Prevalence of polycystic ovary syndrome in unselected women from southern China." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **139**(1): 59-64.
- Chung, B. C., K. J. Matteson, et al. (1986). "Human cholesterol side-chain cleavage enzyme, P450scc: cDNA cloning, assignment of the gene to chromosome 15, and expression in the placenta." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(23): 8962-6.
- Cousin, P., L. Calemard-Michel, et al. (2004). "Influence of SHBG gene pentanucleotide TAAAA repeat and D327N polymorphism on serum sex hormone-binding globulin concentration in hirsute women." J Clin Endocrinol Metab **89**(2): 917-24.

- Cousin, P., H. Dechaud, et al. (1998). "Human variant sex hormone-binding globulin (SHBG) with an additional carbohydrate chain has a reduced clearance rate in rabbit." J Clin Endocrinol Metab **83**(1): 235-40.
- Daneshmand, S., S. R. Weitsman, et al. (2002). "Overexpression of theca-cell messenger RNA in polycystic ovary syndrome does not correlate with polymorphisms in the cholesterol side-chain cleavage and 17alpha-hydroxylase/C(17-20) lyase promoters." Fertil Steril **77**(2): 274-80.
- Davey Smith, G. and M. Egger (1998). "Meta-analysis. Unresolved issues and future developments." BMJ **316**(7126): 221-5.
- Delgado-Rodriguez, M. (2001). "Glossary on meta-analysis." J Epidemiol Community Health **55**(8): 534-6.
- DerSimonian, R. and N. Laird (1986). "Meta-analysis in clinical trials." Control Clin Trials **7**(3): 177-88.
- Diamanti-Kandarakis, E., M. I. Bartzis, et al. (2000). "Microsatellite polymorphism (tttta)(n) at -528 base pairs of gene CYP11alpha influences hyperandrogenemia in patients with polycystic ovary syndrome." Fertil Steril **73**(4): 735-41.
- Diamanti-Kandarakis, E., C. R. Kouli, et al. (1999). "A survey of the polycystic ovary syndrome in the Greek island of Lesbos: hormonal and metabolic profile." J Clin Endocrinol Metab **84**(11): 4006-11.
- Dokras, A., M. Bochner, et al. (2005). "Screening women with polycystic ovary syndrome for metabolic syndrome." Obstet Gynecol **106**(1): 131-7.
- Egger, M., G. Davey Smith, et al. (1997). "Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test." BMJ **315**(7109): 629-34.
- Egger, M. and G. D. Smith (1998). "Bias in location and selection of studies." BMJ **316**(7124): 61-6.
- Eriksson, A. L., M. Lorentzon, et al. (2006). "SHBG gene promoter polymorphisms in men are associated with serum sex hormone-binding globulin, androgen and androgen metabolite levels, and hip bone mineral density." J Clin Endocrinol Metab **91**(12): 5029-37.
- Escobar-Morreale, H. F., J. I. Botella-Carretero, et al. (2005). "The polycystic ovary syndrome associated with morbid obesity may resolve after weight loss induced by bariatric surgery." J Clin Endocrinol Metab **90**(12): 6364-9.



- Essah, P. A., E. P. Wickham, et al. (2007). "The metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome." Clin Obstet Gynecol **50**(1): 205-25.
- Ferk, P., K. Gersak, et al. (2006). "No association between the microsatellite polymorphism (TTTTA)<sub>n</sub> in the promoter of the CYP11A gene and ovarian hyperstimulation syndrome." J Assist Reprod Genet **23**(1): 29-32.
- Ferk, P., N. Teran, et al. (2007). "The (TAAAA)<sub>n</sub> microsatellite polymorphism in the SHBG gene influences serum SHBG levels in women with polycystic ovary syndrome." Hum Reprod **22**(4): 1031-6.
- Fleming, R., Z. E. Hopkinson, et al. (2002). "Ovarian function and metabolic factors in women with oligomenorrhea treated with metformin in a randomized double blind placebo-controlled trial." J Clin Endocrinol Metab **87**(2): 569-74.
- Franks, S. (1989). "Polycystic ovary syndrome: a changing perspective." Clin Endocrinol (Oxf) **31**(1): 87-120.
- Franks, S. (1991). "The ubiquitous polycystic ovary." J Endocrinol **129**(3): 317-9.
- Franks, S. (2006). "Controversy in clinical endocrinology: diagnosis of polycystic ovarian syndrome: in defense of the Rotterdam criteria." J Clin Endocrinol Metab **91**(3): 786-9.
- Franks, S., N. Gharani, et al. (1997). "The genetic basis of polycystic ovary syndrome." Hum Reprod **12**(12): 2641-8.
- Franks, S., N. Gharani, et al. (1998). "Genetics of polycystic ovary syndrome." Mol Cell Endocrinol **145**(1-2): 123-8.
- Freemantle, N., J. Cleland, et al. (1999). "beta Blockade after myocardial infarction: systematic review and meta regression analysis." BMJ **318**(7200): 1730-7.
- Gaasenbeek, M., B. L. Powell, et al. (2004). "Large-scale analysis of the relationship between CYP11A promoter variation, polycystic ovarian syndrome, and serum testosterone." J Clin Endocrinol Metab **89**(5): 2408-13.
- Gershagen, S., A. Lundwall, et al. (1989). "Characterization of the human sex hormone binding globulin (SHBG) gene and demonstration of two transcripts in both liver and testis." Nucleic Acids Res **17**(22): 9245-58.
- Gharani, N., D. M. Waterworth, et al. (1997). "Association of the steroid synthesis gene CYP11a with polycystic ovary syndrome and hyperandrogenism." Hum Mol Genet **6**(3): 397-402.

- Gilling-Smith, C., D. S. Willis, et al. (1994). "Hypersecretion of androstenedione by isolated thecal cells from polycystic ovaries." J Clin Endocrinol Metab **79**(4): 1158-65.
- Gregoire, G., F. Derderian, et al. (1995). "Selecting the language of the publications included in a meta-analysis: is there a Tower of Babel bias?" J Clin Epidemiol **48**(1): 159-63.
- Grishkovskaya, I., G. V. Avvakumov, et al. (2000). "Crystal structure of human sex hormone-binding globulin: steroid transport by a laminin G-like domain." EMBO J **19**(4): 504-12.
- Hammond, G. L., D. A. Underhill, et al. (1989). "The human sex hormone-binding globulin gene contains exons for androgen-binding protein and two other testicular messenger RNAs." Mol Endocrinol **3**(11): 1869-76.
- Hao, C. F., H. C. Bao, et al. (2009). "Evaluation of association between the CYP11alpha promoter pentanucleotide (TTTTA)<sub>n</sub> polymorphism and polycystic ovarian syndrome among Han Chinese women." Neuro Endocrinol Lett **30**(1): 56-60.
- Higgins, J. P. and S. G. Thompson (2004). "Controlling the risk of spurious findings from meta-regression." Stat Med **23**(11): 1663-82.
- Hogeveen, K. N., M. Talikka, et al. (2001). "Human sex hormone-binding globulin promoter activity is influenced by a (TAAAA)<sub>n</sub> repeat element within an Alu sequence." J Biol Chem **276**(39): 36383-90.
- Homburg, R. (1996). "Polycystic ovary syndrome - from gynaecological curiosity to multisystem endocrinopathy." Hum Reprod **11**(1): 29-39.
- Huda, A., L. Marino-Ramirez, et al. (2009). "Repetitive DNA elements, nucleosome binding and human gene expression." Gene **436**(1-2): 12-22.
- Huedo-Medina, T. B., J. Sanchez-Meca, et al. (2006). "Assessing heterogeneity in meta-analysis: Q statistic or I<sup>2</sup> index?" Psychol Methods **11**(2): 193-206.
- Ioannidis, A., E. Ikononi, et al. "Polymorphisms of the insulin receptor and the insulin receptor substrates genes in polycystic ovary syndrome: a Mendelian randomization meta-analysis." Mol Genet Metab **99**(2): 174-83.
- Ioannidis, J. P., E. E. Ntzani, et al. (2001). "Replication validity of genetic association studies." Nat Genet **29**(3): 306-9.

- Ioannidis, J. P. and T. A. Trikalinos (2005). "Early extreme contradictory estimates may appear in published research: the Proteus phenomenon in molecular genetics research and randomized trials." J Clin Epidemiol **58**(6): 543-9.
- Ioannidis, J. P. and T. A. Trikalinos (2007). "The appropriateness of asymmetry tests for publication bias in meta-analyses: a large survey." CMAJ **176**(8): 1091-6.
- Jakimiuk, A. J., S. R. Weitsman, et al. (2001). "Luteinizing hormone receptor, steroidogenesis acute regulatory protein, and steroidogenic enzyme messenger ribonucleic acids are overexpressed in thecal and granulosa cells from polycystic ovaries." J Clin Endocrinol Metab **86**(3): 1318-23.
- Janne, M., H. K. Deol, et al. (1998). "Human sex hormone-binding globulin gene expression in transgenic mice." Mol Endocrinol **12**(1): 123-36.
- Janne, M. and G. L. Hammond (1998). "Hepatocyte nuclear factor-4 controls transcription from a TATA-less human sex hormone-binding globulin gene promoter." J Biol Chem **273**(51): 34105-14.
- John, M. E., M. C. John, et al. (1984). "Identification and characterization of cDNA clones specific for cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(18): 5628-32.
- Jonard, S., Y. Robert, et al. (2003). "Ultrasound examination of polycystic ovaries: is it worth counting the follicles?" Hum Reprod **18**(3): 598-603.
- Jones, M. R., S. G. Wilson, et al. (2007). "Polymorphism of the follistatin gene in polycystic ovary syndrome." Mol Hum Reprod **13**(4): 237-41.
- Kahal, H., S. L. Atkin, et al. "Pharmacological treatment of obesity in patients with polycystic ovary syndrome." J Obes **2011**: 402052.
- Kahn, C. R., J. S. Flier, et al. (1976). "The syndromes of insulin resistance and acanthosis nigricans. Insulin-receptor disorders in man." N Engl J Med **294**(14): 739-45.
- Legro, R. S. (2003). "Diagnostic criteria in polycystic ovary syndrome." Semin Reprod Med **21**(3): 267-75.
- Liu, Q., W. Gu, et al. (2008). "The association of TAAAn repeat polymorphism in sex hormone-binding protein gene with polycystic ovary syndrome in Chinese population." Endocrine **34**(1-3): 62-7.
- Martin, J. L., V. Perez, et al. (2005). "Is grey literature essential for a better control of publication bias in psychiatry? An example from three meta-analyses of schizophrenia." Eur Psychiatry **20**(8): 550-3.

- Martin, R., Mayes, Ed. (1985). Biochemistry.
- McGeown, J. G. "Physiology of reproduction". Human Physiology. P. X. Paschalidis: 303-318
- Minelli, C., J. R. Thompson, et al. (2005). "The choice of a genetic model in the meta-analysis of molecular association studies." Int J Epidemiol **34**(6): 1319-28.
- Moggetti, P., R. Castello, et al. (2000). "Metformin effects on clinical features, endocrine and metabolic profiles, and insulin sensitivity in polycystic ovary syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled 6-month trial, followed by open, long-term clinical evaluation." J Clin Endocrinol Metab **85**(1): 139-46.
- Morohashi, K., Y. Fujii-Kuriyama, et al. (1984). "Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for mRNA of mitochondrial cytochrome P-450(SCC) of bovine adrenal cortex." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(15): 4647-51.
- Morohashi, K., S. Honda, et al. (1992). "A common trans-acting factor, Ad4-binding protein, to the promoters of steroidogenic P-450s." J Biol Chem **267**(25): 17913-9.
- Nelson, V. L., R. S. Legro, et al. (1999). "Augmented androgen production is a stable steroidogenic phenotype of propagated theca cells from polycystic ovaries." Mol Endocrinol **13**(6): 946-57.
- Norman, R. J., D. Dewailly, et al. (2007). "Polycystic ovary syndrome." Lancet **370**(9588): 685-97.
- O. Faiz, D. M., Ed. Ανατομία με μια ματιά.
- P.Kalrson, W. G., W.Gob, Ed. Clinical Pathological Biochemistry.
- Pan, Z., T. A. Trikalinos, et al. (2005). "Local literature bias in genetic epidemiology: an empirical evaluation of the Chinese literature." PLoS Med **2**(12): e334.
- Pasquali, R., F. Casimirri, et al. (1997). "Weight control and its beneficial effect on fertility in women with obesity and polycystic ovary syndrome." Hum Reprod **12 Suppl 1**: 82-7.
- Perez, M. S., G. E. Cerrone, et al. (2008). "[Polymorphism in CYP11alpha and CYP17 genes and the etiology of hyperandrogenism in patients with polycystic ovary syndrome]." Medicina (B Aires) **68**(2): 129-34.
- Pugeat, M., N. Nader, et al. "Sex hormone-binding globulin gene expression in the liver: drugs and the metabolic syndrome." Mol Cell Endocrinol **316**(1): 53-9.

- Pusalkar, M., P. Meherji, et al. (2009). "CYP11A1 and CYP17 promoter polymorphisms associate with hyperandrogenemia in polycystic ovary syndrome." Fertil Steril **92**(2): 653-9.
- Rebar, R., H. L. Judd, et al. (1976). "Characterization of the inappropriate gonadotropin secretion in polycystic ovary syndrome." J Clin Invest **57**(5): 1320-9.
- Russel, Ed. (2009). Genetics, Μενδελική κληρονομικότητα.
- San Millan, J. L., J. Sancho, et al. (2001). "Role of the pentanucleotide (tttta)(n) polymorphism in the promoter of the CYP11a gene in the pathogenesis of hirsutism." Fertil Steril **75**(4): 797-802.
- Segal, E., Y. Fondufe-Mittendorf, et al. (2006). "A genomic code for nucleosome positioning." Nature **442**(7104): 772-8.
- Selva, D. M., K. N. Hogeveen, et al. (2007). "Monosaccharide-induced lipogenesis regulates the human hepatic sex hormone-binding globulin gene." J Clin Invest **117**(12): 3979-87.
- Sherwood, L. The Reproductive System. Human Physiology From Cells to Systems Sixth Edition. I. S. EDITION.
- Shi, J. Q. and J. B. Copas (2004). "Meta-analysis for trend estimation." Stat Med **23**(1): 3-19; discussion 159-62.
- Sorensen, K., A. M. Andersson, et al. (2007). "Serum sex hormone-binding globulin levels in healthy children and girls with precocious puberty before and during gonadotropin-releasing hormone agonist treatment." J Clin Endocrinol Metab **92**(8): 3189-96.
- Sparkes, R. S., I. Klisak, et al. (1991). "Regional mapping of genes encoding human steroidogenic enzymes: P450scc to 15q23-q24, adrenodoxin to 11q22; adrenodoxin reductase to 17q24-q25; and P450c17 to 10q24-q25." DNA Cell Biol **10**(5): 359-65.
- Stanley T. D. , J. S. B. (2006). "META-REGRESSION ANALYSIS: A QUANTITATIVE METHOD OF LITERATURE SURVEYS." Economic Surveys.
- Staurinos, P. (2006). Biostatistics.
- Stroup, D. F., J. A. Berlin, et al. (2000). "Meta-analysis of observational studies in epidemiology: a proposal for reporting. Meta-analysis Of Observational Studies in Epidemiology (MOOSE) group." JAMA **283**(15): 2008-12.

- Taylor, A. E., B. McCourt, et al. (1997). "Determinants of abnormal gonadotropin secretion in clinically defined women with polycystic ovary syndrome." J Clin Endocrinol Metab **82**(7): 2248-56.
- Tchernof, A., M. J. Toth, et al. (1999). "Sex hormone-binding globulin levels in middle-aged premenopausal women. Associations with visceral obesity and metabolic profile." Diabetes Care **22**(11): 1875-81.
- Tirosh, I., N. Barkai, et al. (2009). "Promoter architecture and the evolvability of gene expression." J Biol **8**(11): 95.
- Trikalinos, T. A., E. E. Ntzani, et al. (2004). "Establishment of genetic associations for complex diseases is independent of early study findings." Eur J Hum Genet **12**(9): 762-9.
- van Houwelingen, H. C., L. R. Arends, et al. (2002). "Advanced methods in meta-analysis: multivariate approach and meta-regression." Stat Med **21**(4): 589-624.
- Villanueva, E. V. and S. Zavarsek (2004). "Evaluating heterogeneity in cumulative meta-analyses." BMC Med Res Methodol **4**: 18.
- Wang, Y., X. Wu, et al. (2006). "A microsatellite polymorphism (tttta)n in the promoter of the CYP11a gene in Chinese women with polycystic ovary syndrome." Fertil Steril **86**(1): 223-6.
- Wang, Y., X. K. Wu, et al. (2005). "[Microsatellite polymorphism of (tttta) n in the promoter of CYP11a gene in Chinese women with polycystic ovary syndrome]." Zhonghua Yi Xue Za Zhi **85**(48): 3396-400.
- Wickenheisser, J. K., P. G. Quinn, et al. (2000). "Differential activity of the cytochrome P450 17alpha-hydroxylase and steroidogenic acute regulatory protein gene promoters in normal and polycystic ovary syndrome theca cells." J Clin Endocrinol Metab **85**(6): 2304-11.
- Womack, C., S. Roger, et al. (1997). "Disclosure of clinical audit records in law: risks and possible defences." BMJ **315**(7119): 1369-70.
- Xita, N., I. Georgiou, et al. (2008). "The role of sex hormone-binding globulin and androgen receptor gene variants in the development of polycystic ovary syndrome." Hum Reprod **23**(3): 693-8.
- Xita, N., I. Georgiou, et al. (2008). "The synergistic effect of sex hormone-binding globulin and aromatase genes on polycystic ovary syndrome phenotype." Eur J Endocrinol **158**(6): 861-5.

- Xita, N., A. Tsatsoulis, et al. (2003). "Association of the (TAAAA)n repeat polymorphism in the sex hormone-binding globulin (SHBG) gene with polycystic ovary syndrome and relation to SHBG serum levels." J Clin Endocrinol Metab **88**(12): 5976-80.
- Yen, S. S., P. Vela, et al. (1970). "Inappropriate secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in polycystic ovarian disease." J Clin Endocrinol Metab **30**(4): 435-42.
- Zhao, J. L., Z. J. Chen, et al. (2005). "[Study on the (TAAAA)n repeat polymorphism in sex hormone-binding globulin gene and the SHBG serum levels in putative association with the glucose metabolic status of Chinese patients suffering from polycystic ovarian syndrome in Shandong province]." Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi **22**(6): 644-7.
- Zondervan, K. T. and L. R. Cardon (2004). "The complex interplay among factors that influence allelic association." Nat Rev Genet **5**(2): 89-100.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 : ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ**



## ΜΕΛΕΤΕΣ ΠΟΥ ΑΠΟΡΡΙΦΘΗΚΑΝ

**Πίνακας 1: Μελέτες που δεν συμπεριλήφθηκαν στην μετά-ανάλυση.**

PMID	YEAR	COUNTRY	REJECTION REASON
21261118	2010	Czech	Pro156Leu SHBG polymorphism
21252242	2011	Richmond	no (TAAAA) <sub>n</sub>
20691435	2010	Spain	Metformin therapy(no data)
19679209	2009	USA	no (TAAAA) <sub>n</sub>
19179433	2009	Canada	no (TAAAA) <sub>n</sub>
19327767	2010	USA	(HMGCR) gene
18362511	2008	Sweden	CYP21 mutation
17342155	2007	UK	KCNJ11 E23K variant
17284512	2007	Australia	follistatin
17258903	2007	Czech	D327N polymorphism
17097651	2007	Santiago	no (TAAAA) <sub>n</sub> (endometria)
16556719	2006	Turkey	Micronucleus frequencies
16350721	2005	Poland	review
16103714	2005	USA	Androgen disorders
16084882	2005	Turkey	Gly972Arg variant
15879463	2005	Ioannina	No data(menachre)
15209536	2004	Czech	Refer to male
15181086	2004	USA	(AU)AT rich element polymorphism
15193488	2004	Austria	Interleukin 6 gene
15159300	2004	USA	CYP11A gene polymorphism- breast cancer risk

15054879	2004	Japan	CYP11A1 gene- prostate cancer
12880121	2003	USA	D85 and Y85 variants
11937112	2002	Spain	Insulin gene
11872216	2002	Spain	Caplain 10
11502783	2001	Spain	insulin
11334920	2001	Spain	follistatin
11149629	2000	Germany	the long arm of chromosome 11
10999817	2000	Spain	no (TAAAA) <sub>n</sub>
10626549	1999	Spain	Insulin
10599993	1999	USA	Plasminogen activator inhibitor
10456185	1999	UK	Review
10411917	1999	USA	follistatin
9922108	1998	UK	Review
9455828	1997	UK	Review
7586598	1995	UK	LH-beta subunit variant
k8567821	1995	Israel	insulin

---

# ΔΙΕΞΑΓΩΓΗ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗΣ

## ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ (ΤΑΑΑΑ)<sub>n</sub> ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ SHBG

Για τα αλληλόμορφα του γονιδίου L versus S

- `generate oral=log((l1*s0)/(s1*l0))`

Υπολογίζουμε το odds ratio

- `replace  
oral=log(((0.5+l1)*(0.5+s0))/((0.5+s1)*(0.5+l0)))  
if l1==0|s0==0|s1==0|l0==0`

Αντικαθιστούμε το odds ratio σε περίπτωση που οι μεταβλητές είναι αυτές είναι 0

- `generate stdor=sqrt(1/s1+1/l1+1/s0+1/l0)`

Υπολογίζουμε το standard error

- `replace  
stdor=sqrt(1/(s1+0.5)+1/(l1+0.5)+1/(s0+0.5)+1/(l0+0.5))  
if l1==0|l1==0|s0==0|l0==0`

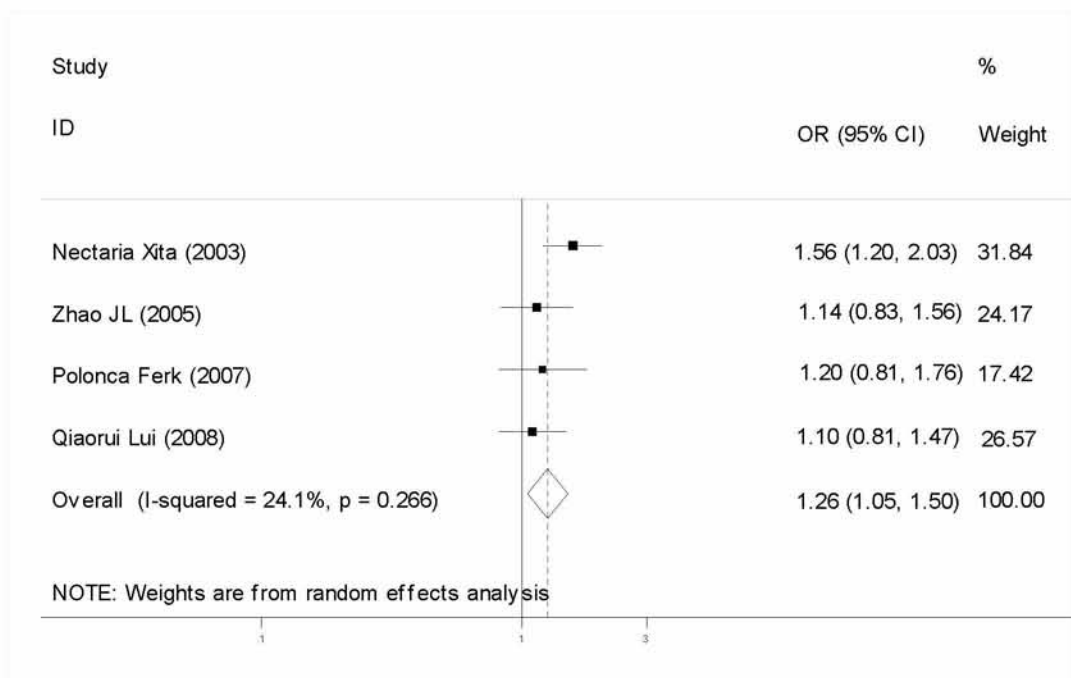
Αντικαθιστούμε το standard error σε περίπτωση που οι μεταβλητές είναι αυτές είναι 0

- `metan l1 l0 s1 s0 , or random sortby(year)  
label(namevar=author,yearvar=year) xlab(0.1,1,3)`

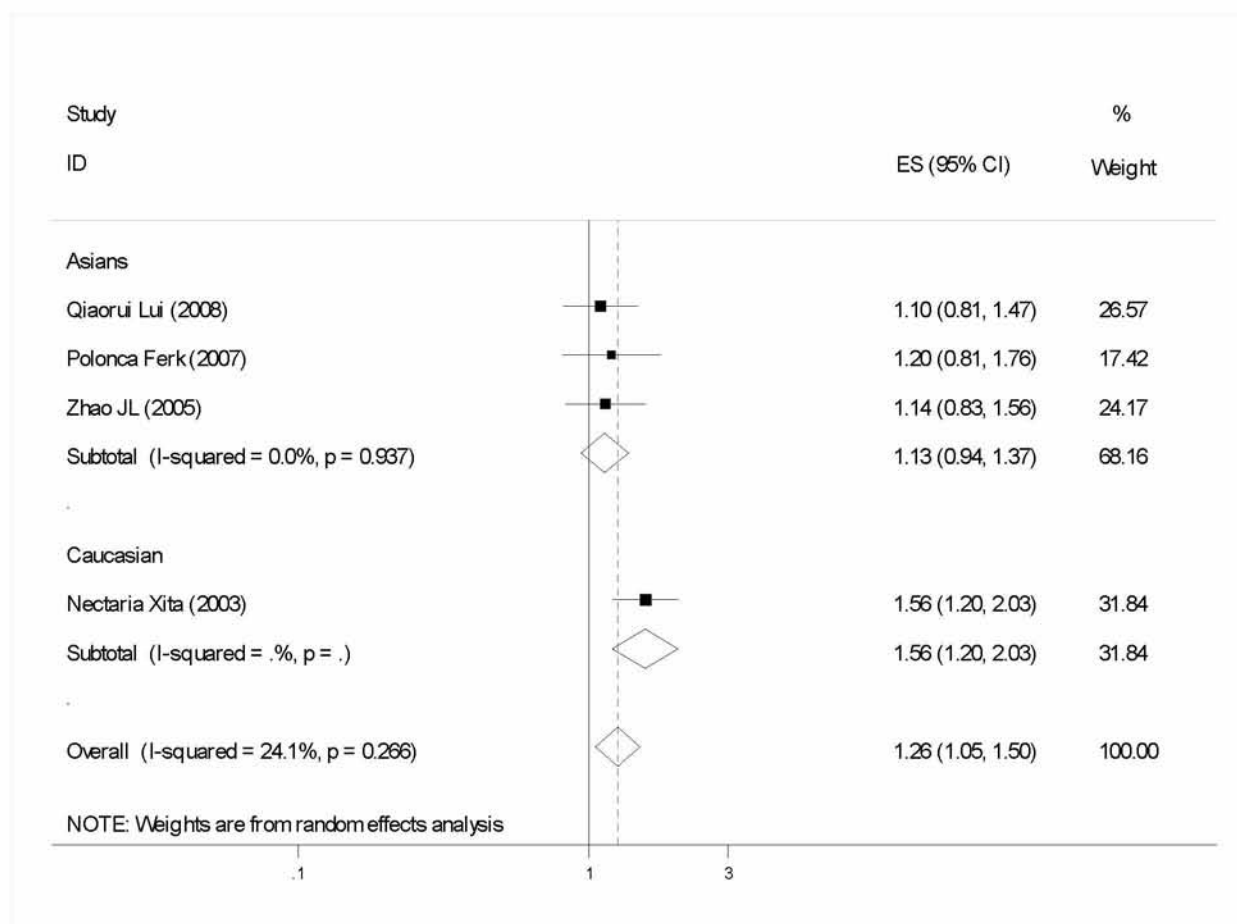
Μετά-ανάλυση

- `metan oral stdor, eform random by(race)  
label(namevar=author,yearvar=year) xlab(0.1,1,3)`

Μετά-ανάλυση ως προς την φυλή



**Εικόνα 1: Το forest plot για την μετά-ανάλυση.**



**Εικόνα 2: Το forest plot για την μετά-ανάλυση κατά φυλή.**

**Εικόνα 3: Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την εκτέλεση εντολής metan είναι:**

Study	OR	[95% Conf. Interval]		% Weight
Nectaria Xita (2003)	1. 562	1. 204	2. 028	31.84
Zhao JL (2005)	1. 136	0. 829	1. 557	24.17
Polonca Ferk (2007)	1. 197	0. 814	1. 763	17.42
Qiaorui Luis (2008)	1. 095	0. 815	1. 472	26.57
D+L pooled OR	1.257	1. 053	1. 500	100. 00

Heterogeneity chi-squared = 3.95 (d. f. = 3) p = 0. 266

I-squared (variation in OR attributable to heterogeneity) = 24.1%

Estimate of between-study variance Tau-squared = 0.0079

Test of OR=1 : z= 2.53 p = 0.011

**Πίνακας 2:Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την εκτέλεση της εντολής metan με διαχωρισμό της φυλής:**

Study	OR	[95% Conf. Interval]		% Weight
Asians				
Zhao JL (2005)	1. 136	0.829	1.557	24.17
Polonca Ferk (2007)	1. 197	0.814	1.763	17.42
Qiaorui Lui (2008)	1. 095	0.815	1. 472	26.57
D+L pooled ES	1.133	0.939	1. 368	68.16
Caucasians				
Nectaria Xita (2003)	1. 562	1. 204	2. 028	31.84
D+L pooled ES	1. 562	1. 204	2. 028	31.84
Overall				
D+L pooled ES	1.257	1. 053	1. 500	100. 00

Test(s) of heterogeneity:

	Heterogeneity statistic	degrees of freedom	p	I-squared**	Tau-squared
Asians	0.13	2	0.937	0.0%	0.0000
Caucasian	0.00	0.	.%		0.0000
Overall	3.95	3	0.266	24.1%	0.0079

\*\* I-squared: the variation in ES attributable to heterogeneity)

Note: between group heterogeneity not calculated;  
only valid with inverse variance method

Significance test(s) of ES=1

Asians	z=1.30	p=0.192
Caucasian	z=3.35	p=0.001
Overall	z=2.53	p=0.011

Για τους γονότυπους LL versus SS+SL

- generate odll=log((l11\*nol10)/(l10\*nol11))

Υπολογίζουμε το odds ratio, όπου noll το άθροισμα των ss, sl των υγιών και των ασθενών.

- `replace  
odl1=log(((0.5+l11)*(0.5+noll10))/((0.5+l10)*(0.5+noll1))) if l11==0|noll10==0|l10==0|noll1==0`

Αντικαθιστούμε το odds ratio σε περίπτωση που οι μεταβλητές είναι αυτές είναι 0

- `generate stdl1=sqrt(1/l11+1/noll1+1/l10+1/noll0)`

Υπολογίζουμε το standard error

- `replace  
stdl1=sqrt(1/(l11+0.5)+1/(noll1+0.5)+1/(l10+0.5)+1/(noll0+0.5)) if l11==0|noll10==0|l10==0|noll1==0`

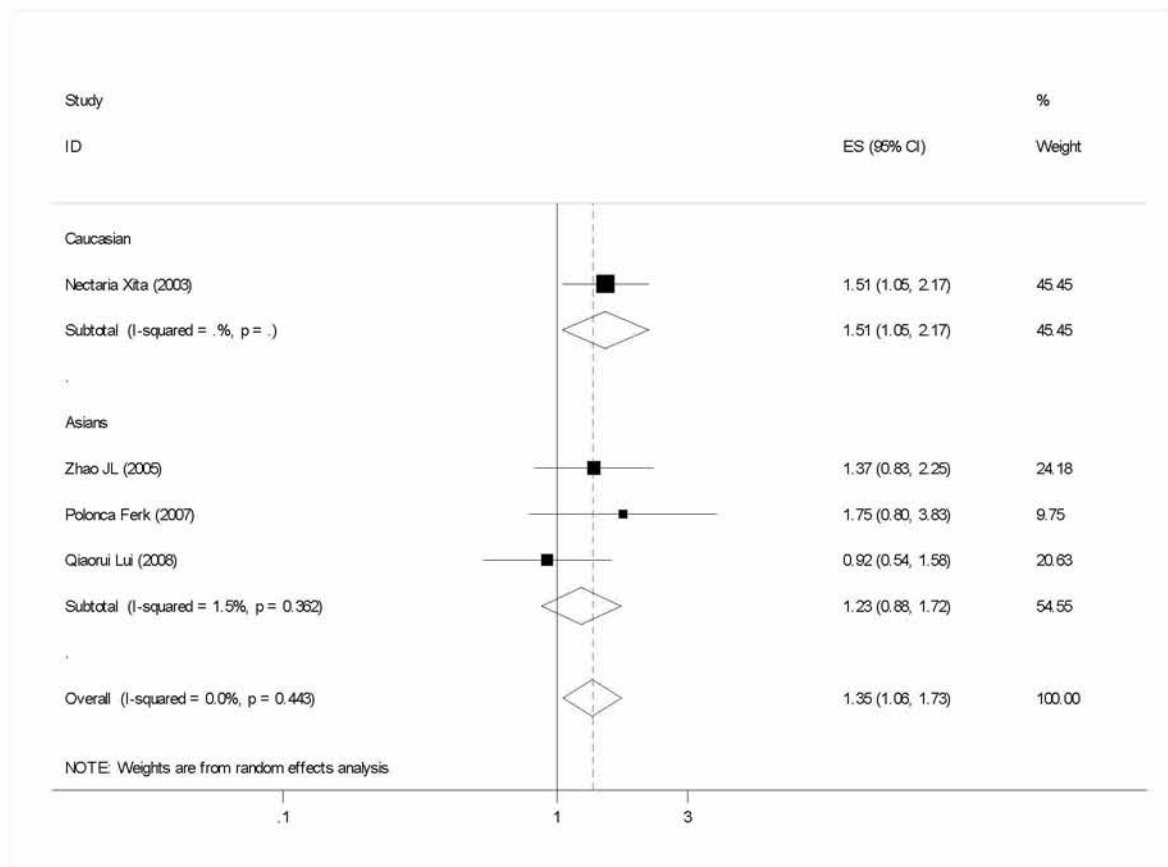
Αντικαθιστούμε το standard error σε περίπτωση που οι μεταβλητές είναι αυτές είναι 0

- `metan l11 l10 noll1 noll0 , or random sortby(year)  
label(namevar=author,yearvar=year) xlab(0.1,1,3)`

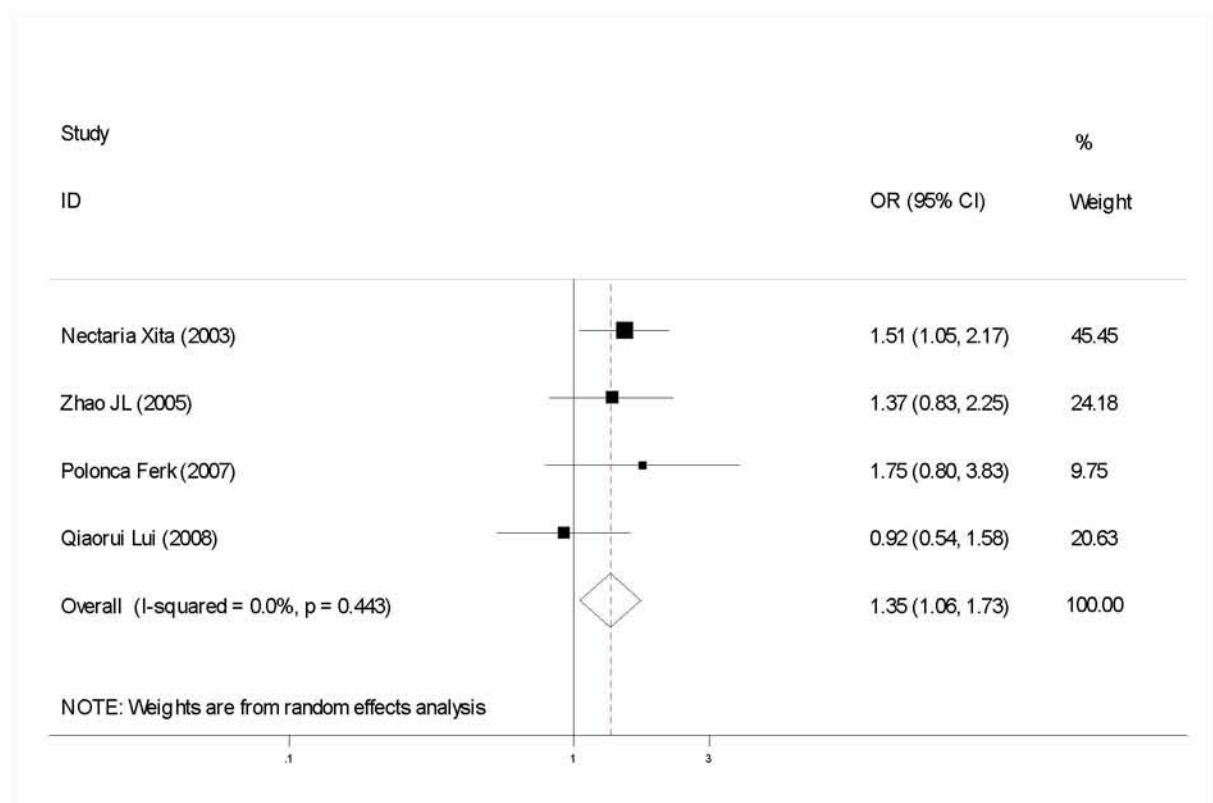
Μετά-ανάλυση

- `metan odl1 stdl1,eform random by(race)  
label(namevar=author,yearvar=year) xlab(0.1,1,3)`

Μετά-ανάλυση ως προς την φυλή



**Εικόνα 4: Το forest plot για την μετα-ανάλυση κατά φυλή.**



**Εικόνα 5: Το forest plot για την μετα-ανάλυση των γονοτύπων LL versus SS + SL.**

**Πίνακας 4: Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την εκτέλεση εντολής metan είναι.**

Study	OR	[95% Conf. Interval]		% Weight
Nectaria Xita (2003)	1.509	1.048	2.171	31.84
Zhao JL (2005)	1.367	0.830	2.252	24.17
Polonca Ferk (2007)	1.748	0.797	3.834	9.75
Qiaorui Lui (2008)	1.748	0.797	3.834	9.75
D+L pooled OR	1.350	1.350	1.057	100.00

Heterogeneity chi-squared = 2.68 (d.f. = 3) p = 0.443  
I-squared (variation in OR attributable to heterogeneity) = 0.0%  
Estimate of between-study variance Tau-squared = 0.0000  
Test of OR=1 : z= 2.40 p = 0.016

**Πίνακας 5: Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την εκτέλεση της εντολής metan με διαχωρισμό της φυλής:**

Study	OR	[95% Conf. Interval]		% Weight
Asians				
Zhao JL (2005)	1.367	0.830	2.252	24.17
Polonca Ferk (2007)	1.748	0.797	3.834	9.75
Qiaorui Lui (2008)	1.748	0.797	3.834	9.75
D+L pooled ES	1.232	0.881	1.722	54.55
Caucasians				
Nectaria Xita (2003)	1.509	1.048	2.171	45.45
D+L pooled ES	1.509	1.048	2.171	45.45
Overall	1.350	1.350	1.057	100.00
D+L pooled ES				

Test(s) of heterogeneity:

	Heterogeneity statistic	degrees of freedom	p	I-squared**	Tau-squared
Asians	2.03	2	0.362	1.5%	0.0014
Caucasian	0.00	0.	.%		0.0000
Overall	2.68	3	0.443	0.0%	0.0000

\*\* I-squared: the variation in ES attributable to heterogeneity)

Note: between group heterogeneity not calculated;  
only valid with inverse variance method

Significance test(s) of ES=1

Asians	z=1.22	p= 0.223
Caucasian	z=2.21	p=0.027
Overall	z=2.40	p=0.016



### Για τους γονότυπους LL+SL versus SS

- `generate odss=log((noss1*ss0)/(noss0*ss1))`

Υπολογίζουμε το odds ratio, όπου noss το άθροισμα των ll, sl των ασθενών και των υγιών.

- `replace  
odss=log(((0.5+noss1)*(0.5+ss0))/((0.5+noss0)*(0.5+ss1))) if noss1==0|ss0==0|noss0==0|ss1==0`

Αντικαθιστούμε το odds ratio σε περίπτωση που οι μεταβλητές είναι αυτές είναι 0

- `generate stdss=sqrt(1/ss1+1/noss1+1/ss0+1/noss0)`

Υπολογίζουμε το standard error

- `replace  
stdss=sqrt(1/(ss1+0.5)+1/(noss1+0.5)+1/(ss0+0.5)+1/(noss0+0.5)) if noss1==0|ss0==0|noss0==0|ss1==0`

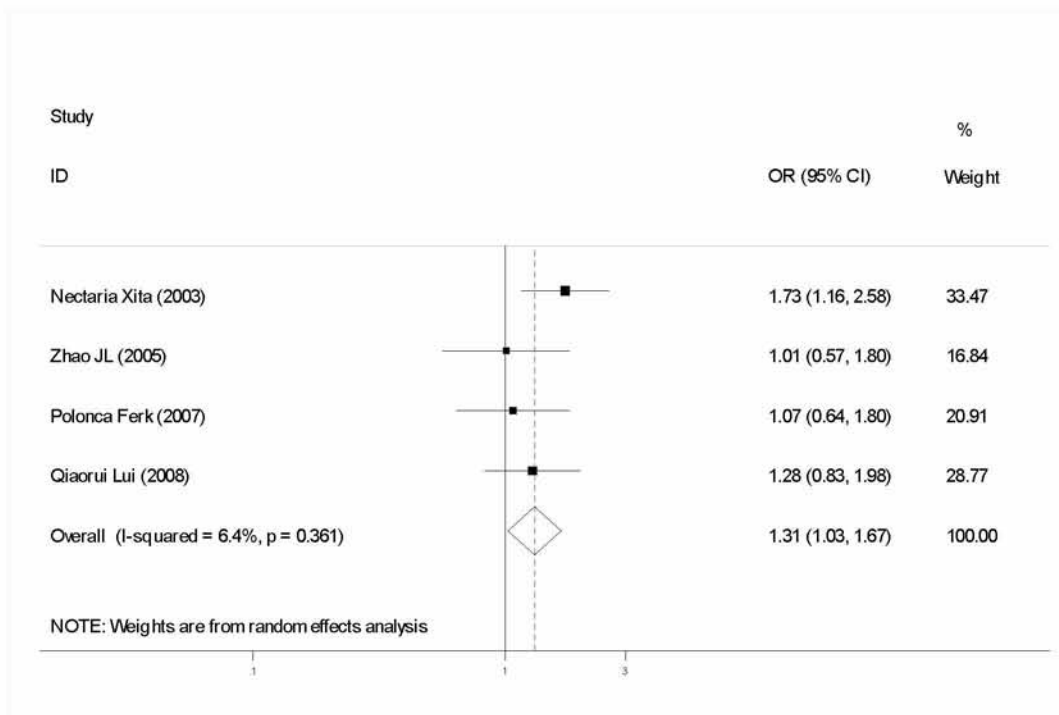
Αντικαθιστούμε το standard error σε περίπτωση που οι μεταβλητές είναι αυτές είναι 0

- `metan noss1 noss0 ss1 ss0 , or random sortby(year)  
label(namevar=author,yearvar=year) xlab(0.1,1,3)`

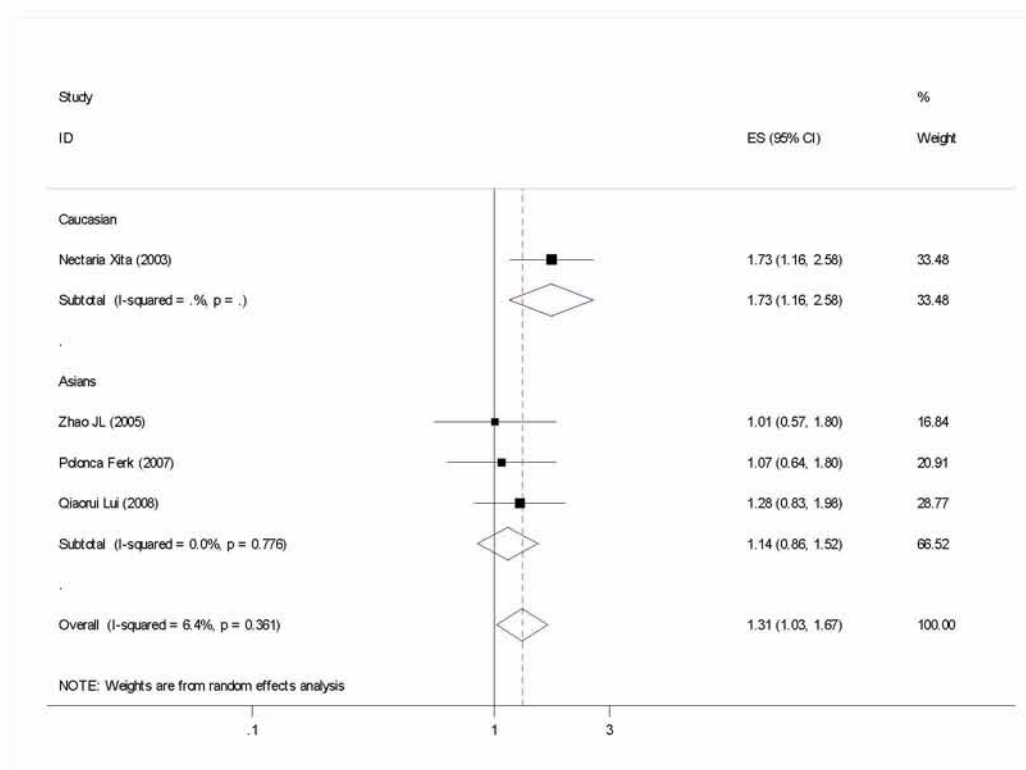
Μετά-ανάλυση

- `metan odss stdss,eform random by(race)  
label(namevar=author,yearvar=year) xlab(0.1,1,3)`

Μετά-ανάλυση ως προς την φυλή



Εικόνα 6: Το forest plot για την μετά-ανάλυση των γονοτύπων SS versus SL + LL



Εικόνα 7: Το forest plot για την μετά-ανάλυση κατά φυλή των γονοτύπων SS versus SL + LL

**Πίνακας 6: Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την εκτέλεση εντολής metan είναι:**

Study	OR	[95% Conf. Interval]	% Weight
Nectaria Xita (2003)	1.727	1.157 2.578	33.47
Zhao JL (2005)	1.008	0.565 1.797	16.84
Polonca Ferk (2007)	1.073	0.640 1.797	20.91
Qiaorui Lui (2008)	1.282	0.830 1.980	28.77
D+L pooled OR	1.310	1.028 1.670	100.00

Heterogeneity chi-squared = 3.21 (d.f. = 3) p = 0.361  
I-squared (variation in OR attributable to heterogeneity) = 6.4%  
Estimate of between-study variance Tau-squared = 0.0040  
Test of OR=1 : z= 2.18 p = 0.029

**Πίνακας 7: Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την εκτέλεση της εντολής metan με διαχωρισμό της φυλής:**

Study	OR	[95% Conf. Interval]	% Weight
<b>Asians</b>			
Zhao JL (2005)	1.008	0.565 1.797	16.84
Polonca Ferk (2007)	1.073	0.640 1.797	20.91
Qiaorui Lui (2008)	1.282	0.830 1.980	28.77
D+L pooled ES	1.142	0.856 1.524	66.52
<b>Caucasians</b>			
Nectaria Xita (2003)	1.727	1.157 2.578	33.47
D+L pooled ES	1.727	1.157 2.578	33.47
Overall	1.310	1.028 1.670	100.00
D+L pooled ES			

Test(s) of heterogeneity:

	Heterogeneity statistic	degrees of freedom	p	I-squared**	Tau-squared
Asians	0.51	2	0.776	0.0%	0.0000
Caucasian	0.00	0.	0.0%		0.0000
Overall	2.68	3	0.443	0.0%	0.0000

\*\* I-squared: the variation in ES attributable to heterogeneity)

Note: between group heterogeneity not calculated;  
only valid with inverse variance method

Significance test(s) of ES=1

Asians	z=0.90	p= 0.366
Caucasian	z=2.67	p=0.007
Overall	z=2.18	p=0.029

## ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ (TTTTA)<sub>n</sub> ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ CYP11a

### Για τα αλληλόμορφα 4R- versus 4R+

- `generate oral=log((a4r01*a4r10)/(a4r11*a4r00))`

Υπολογίζουμε το odds ratio, όπου a4r11 είναι 4R+ των ασθενών, a4r11 είναι το 4R+ των ασθενών

- `replace  
oral=log(((0.5+a4r11)*(0.5+a4r00))/((0.5+a4r01)*(0.5  
+a4r10))) if a4r11==0|a4r00==0|a4r01==0|a4r10==0`

Αντικαθιστούμε το odds ratio σε περίπτωση που οι μεταβλητές είναι αυτές είναι 0

- `generate stdor=sqrt(1/a4r11+1/a4r00+1/a4r10+1/a4r01)`

Υπολογίζουμε το standard error

- `replace  
stdor=sqrt(1/(a4r11+0.5)+1/(a4r00+0.5)+1/(a4r10+0.5)  
+1/(a4r01+0.5)) if  
a4r11==0|a4r00==0|a4r10==0|a4r01==0`

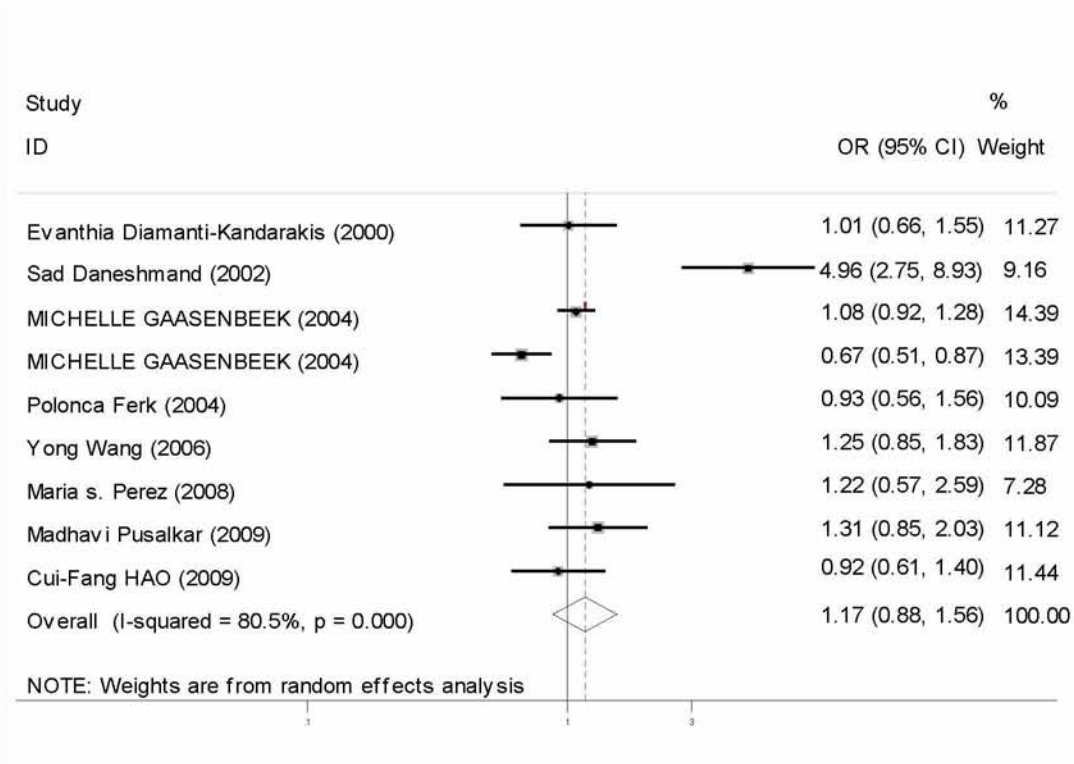
Αντικαθιστούμε το standard error σε περίπτωση που οι μεταβλητές είναι αυτές είναι 0

- `metan a4r01 a4r00 a4r11 a4r10, or random  
sortby(year) label(namevar=author,yearvar=year)  
xlab(0.1,1,3)`

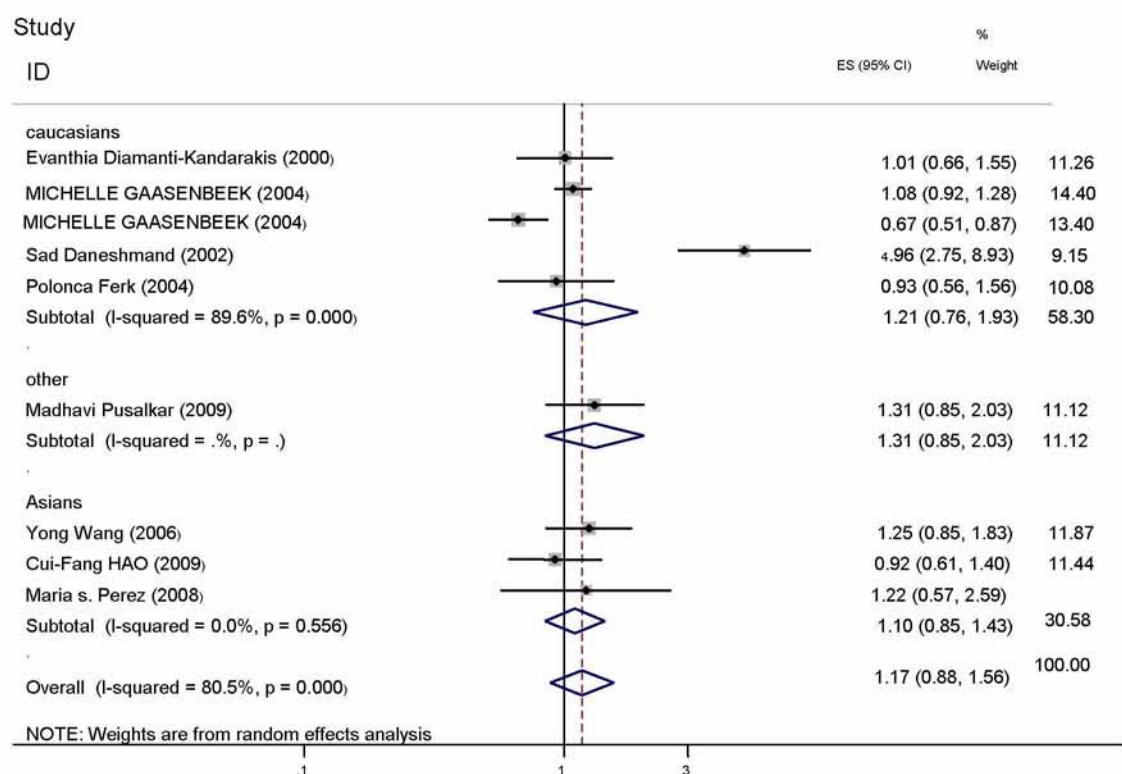
### Μετά-ανάλυση

- `metan oral stdor, eform random by(race)  
label(namevar=author,yearvar=year) xlab(0.1,1,3)`

Μετά-ανάλυση ως προς την φυλή



Εικόνα 8: Το forest plot για την μετά-ανάλυση των αλληλόμορφα 4R- versus 4R+ κατά φυλή.



Εικόνα 9: Το forest plot για την μετά-ανάλυση των αλληλόμορφα 4R- versus 4R+ κατά φυλή.

**Πίνακας 8: Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την εκτέλεση εντολής metan είναι:**

Study	OR	[95% Conf. Interval]		% Weight
Diamanti	1.011	0.660	1.549	11.27
Sa'd Daneshmand	4.960	2.755	8.931	9.16
MICHELLE GAASENBEEK	1.083	0.919	1.277	14.39
MICHELLE GAASENBEEK	0.666	0.513	0.867	13.39
Polonca Ferk (2004)	0.933	0.558	1.562	10.09
Yong Wang (2006)	1.249	0.853	1.830	11.87
Maria s. Perez (2008)	1.215	0.570	2.590	7.28
Madhavi Pusalkar	1.313	0.848	2.032	11.12
Cui Fang HAO	0.924	0.611	1.397	11.44
D+L pooled OR	1.173	0.884	1.558	100.00

Heterogeneity chi-squared = 41.12 (d.f. = 8) p = 0.000

I-squared (variation in OR attributable to heterogeneity) = 80.5%

Estimate of between-study variance Tau-squared = 0.1382

Test of OR=1 : z= 1.11 p = 0.268

**Πίνακας 9: Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την εκτέλεση της εντολής metan με διαχωρισμό της φυλής είναι:**

Study	OR	[95% Conf. Interval]		% Weight
Asians				
Yong Wang (2006)	1.249	0.853	1.830	11.87
Maria s. Perez (2008)	1.215	0.570	2.590	7.28
Cui Fang HAO	0.924	0.611	1.397	11.44
Sub-total	1.102	0.847	1.434	30.58
others				
Madhavi Pusalkar	1.313	0.848	2.032	11.12
Sub-total	1.313	0.848	2.032	11.12
Caucasians				
Diamanti	1.011	0.660	1.549	11.27
Sa'd Daneshmand	4.960	2.755	8.931	9.16
MICHELLE GAASENBEEK	1.083	0.919	1.277	14.39
MICHELLE GAASENBEEK	0.666	0.513	0.867	13.39
Polonca Ferk (2004)	0.933	0.558	1.562	10.09
Sub-total	1.213	0.763	1.434	58.30
D+L pooled OR	1.173	0.884	1.558	100.00

Test(s) of heterogeneity:

	Heterogeneity	degrees of	p	I-squared**	Tau-squared
Asians	1.17	2	0.556	0.0%	0.0000
Caucasian	38.50	4	0.000	89.6%	0.2363
other	0.00	0	.	.%	0.0000
Overall	40.96	8	0.000	80.5%	0.1375

\*\* I-squared: the variation in ES attributable to heterogeneity)

Note: between group heterogeneity not calculated;  
only valid with inverse variance method

Significance test(s) of ES=1

Asians	z=0.72	p= 0.469
Caucasian	z=0.82	p=0.415
other	z=1.22	P=0.222
Overall	z=1.11	p=0.268

### Για τους γονότυπους 4R- versus 4R+

- `generate or=log((g4r01*g4r10)/(g4r11*g4r00))`

Υπολογίζουμε το odds ratio

- `replace  
or=log(((0.5+g4r11)*(0.5+g4r00))/((0.5+g4r01)*(0.5+g4r10))) if g4r11==0|g4r00==0|g4r01==0|g4r10==0`

Αντικαθιστούμε το odds ratio σε περίπτωση που οι μεταβλητές είναι αυτές είναι 0

- `generate std=sqrt(1/g4r11+1/g4r00+1/g4r10+1/g4r01)`

Υπολογίζουμε το standard error

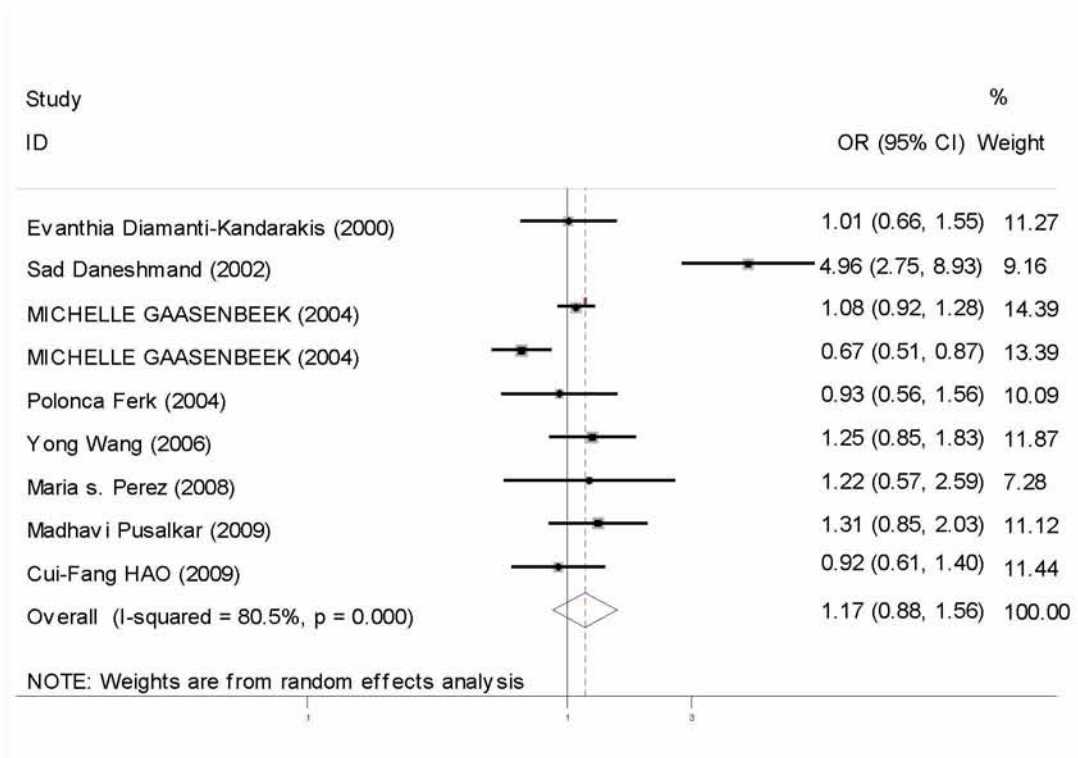
- `replace  
std=sqrt(1/(g4r11+0.5)+1/(g4r11+0.5)+1/(g4r10+0.5)+1/(g4r01+0.5)) if g4r11==0|g4r11==0|g4r10==0|g4r01==0`

Αντικαθιστούμε το standard error σε περίπτωση που οι μεταβλητές είναι αυτές είναι 0

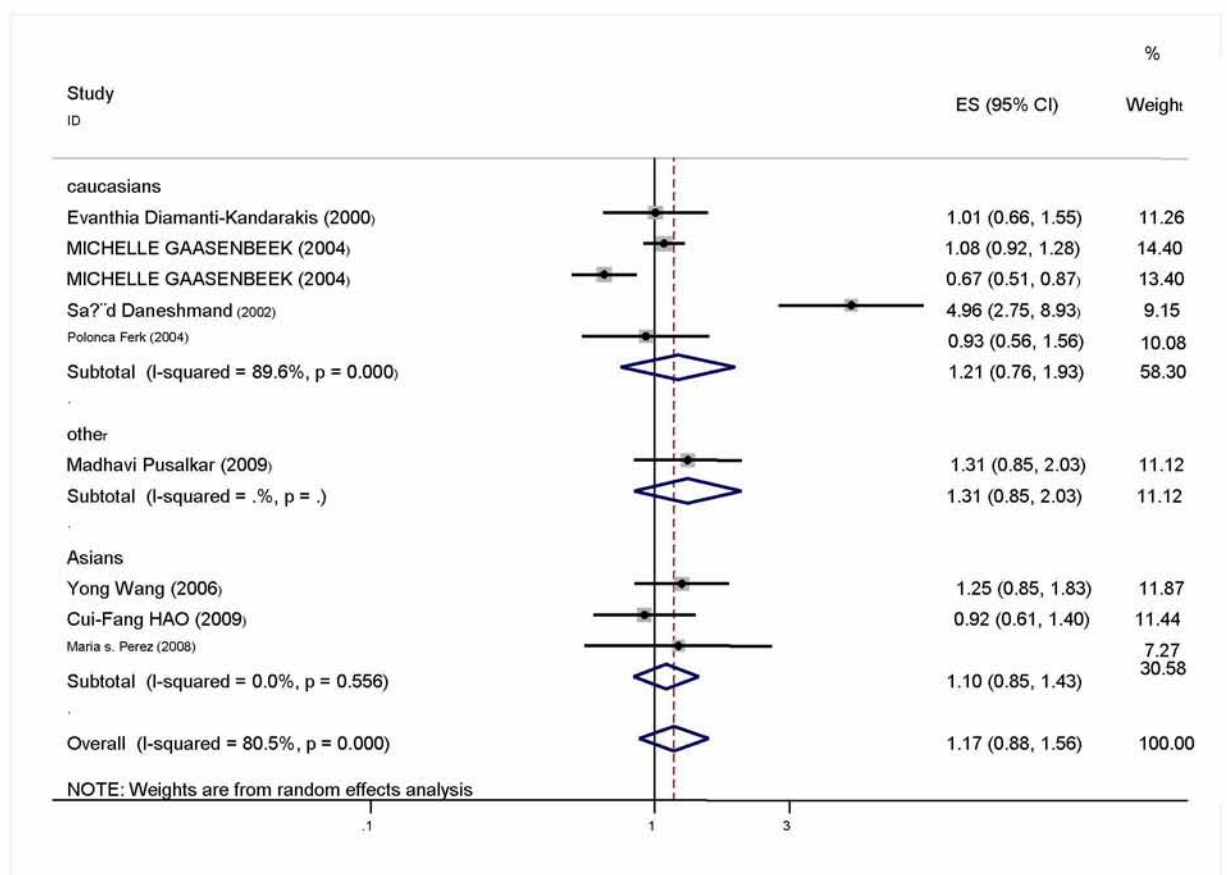
- `metan g4r01 g4r00 g4r11 g4r10, or random  
sortby(year) label(namevar=author,yearvar=year)  
xlab(0.1,1,3) Μετά-ανάλυση`
- `metan or std, eform random by(race)  
label(namevar=author,yearvar=year) xlab(0.1,1,3)`

Μετά-ανάλυση ως προς την φυλή

Εικόνα 9: Το forest plot για την μετά-ανάλυση των γονοτύπων 4R- versus 4R+.



Εικόνα 10: Το forest plot για την μετά-ανάλυση των γονοτύπων 4R+ versus 4R- κατά φυλή.





**Πίνακας 10: Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την εκτέλεση εντολής metan.**

Study	OR	[95% Conf. Interval]		% Weight
Diamanti	2.314	1.054	5.076	8.38
Neda Gharani (1996)	2.199	1.082	4.471	9.47
MICHELLE GAASENBEEK	1.022	0.731	1.428	17.10
MICHELLE GAASENBEEK	0.564	0.338	0.942	13.05
Polonca Ferk (2004)	1.000	0.427	2.341	7.57
Yong Wang (2006)	1.492	0.951	2.340	14.41
JoseL. San Milla	0.810	0.256	2.561	4.89
Madhavi Pusalkar	1.450	0.824	2.552	11.98
Cui Fang HAO	0.882	0.531	1.466	13.15
D+L pooled OR	1.161	0.870	1.549	100.00

Heterogeneity chi-squared = 17.49(d.f. = 8) p = 0.025

I-squared (variation in OR attributable to heterogeneity) = 54.3%

Estimate of between-study variance Tau-squared = 0.0973

Test of OR=1 : z= 1.02 p = 0.310

**Πίνακας 11: Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την εκτέλεση της εντολής metan με διαχωρισμό της φυλής.**

Study	OR	[95% Conf. Interval]		% Weight
Asians				
Cui Fang HAO	0.882	0.531	1.466	13.15
Yong Wang (2006)	1.492	0.951	2.340	14.41
Sub-total	1.163	0.696	1.944	27.56
others				
Madhavi Pusalkar	1.450	0.824	2.552	11.98
Sub-total	1.450	0.824	2.552	11.98
Caucasians				
Diamanti	2.314	1.054	5.076	8.38
Neda Gharani (1996)	2.199	1.082	4.471	9.47
JoseL. San Milla	0.810	0.256	2.561	4.89
MICHELLE GAASENBEEK	1.022	0.731	1.428	17.10
MICHELLE GAASENBEEK	0.564	0.338	0.942	13.05
Polonca Ferk (2004)	1.000	0.427	2.341	7.57
Sub-total	1.130	0.726	1.760	60.46
D+L pooled OR	1.161	0.870	1.549	100.00

Test(s) of heterogeneity:

	Heterogeneity	degrees of	p	I-squared**	Tau-squared
Asians	2.30	1	0.129	56.5%	0.0779
Caucasian	13.92	5	0.016	64.1%	0.1802
other	0.00	0	.	.%	0.0000
Overall	17.49	8	0.025	54.3%	0.0972

\*\* I-squared: the variation in ES attributable to heterogeneity)

Note: between group heterogeneity not calculated;  
only valid with inverse variance method

Significance test(s) of ES=1

Asians	z=0.58	p=0.565
Caucasian	z=0.54	p=0.589
other	z=1.29	P=0.197
Overall	z=1.02	p=0.310

## ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΟΥ ΣΦΑΛΜΑΤΟΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗΣ

Για τα αλληλόμορφα του γονιδίου L versus S

- metabias oral stdor, gr(b)

Έλεγχος με την μέθοδο του Begg

- metabias oral stdor, gr(e)

Έλεγχος με την μέθοδο του Egger

- metareg oral stdor, level(95) wsse(stdor)

Έλεγχος με την μέθοδο της μετά-παλινδρόμησης

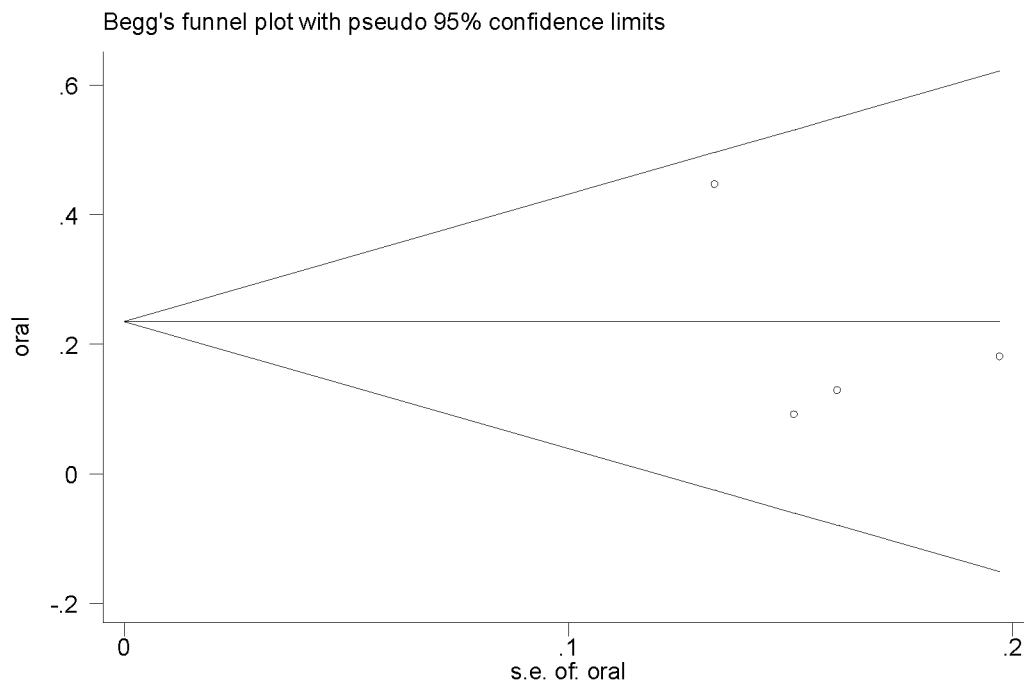
**Πίνακας 12: Τα αποτελέσματα από τον έλεγχο του Begg και του Egger.**

Begg's Test						
adj. Kendall's Score (P-Q) = 0						
Std. Dev. of Score = 2.94						
Number of Studies = 4						
z = 0.00						
Pr >  z  = 1.000						
z = -0.34 (continuity corrected)						
Pr >  z  = 1.000 (continuity corrected)						
Egger's test						
Std_Eff	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
slope	.8920482	.6481028	1.38	0.303	-1.896513	3.680609
bias	-4.25632	4.160454	-1.02	0.414	-22.15731	13.64467

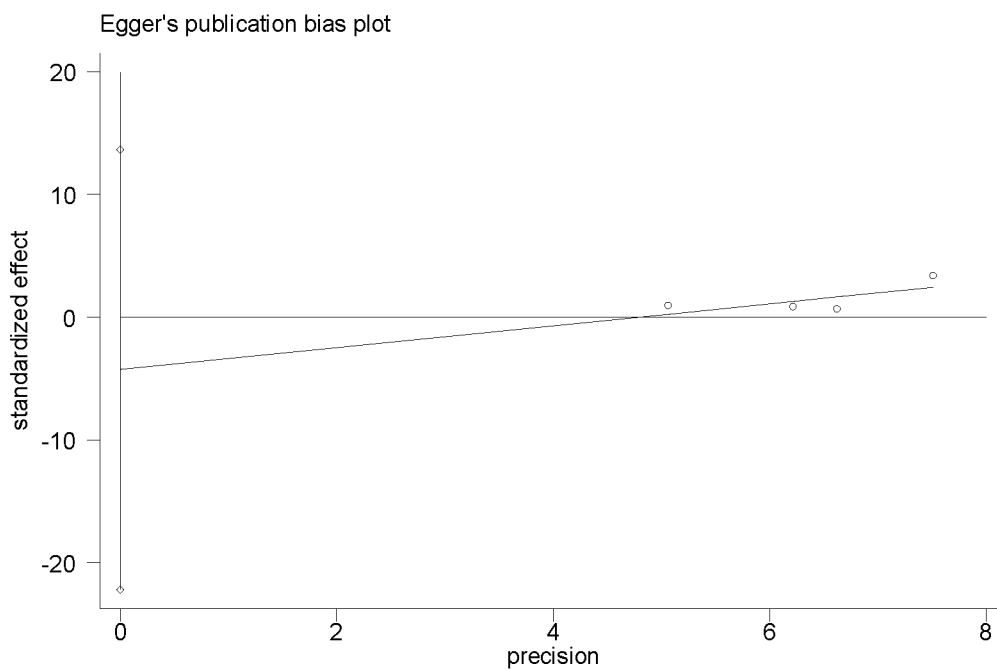
**Πίνακας 13: Τα αποτελέσματα για τον έλεγχο της ετερογένειας με τον έλεγχο της μετά-παλινδρόμησης.**

Meta-analysis regression						No of studies = 4	
						tau^2 method	reml
						tau^2 estimate =	.0088
Successive values of tau^2 differ by less than 10^-4 :convergence achieved							
		Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]	
Stdor		-3.894572	4.187367	-0.93	0.352	-12.10166	4.312516
_cons		.8346116	.65863	1.27	0.205	-.4562795	2.125503

Εικόνα 11: Το διάγραμμα με τον έλεγχο του Begg για τα αλληλόμορφα S versus L.



Εικόνα 12: διάγραμμα με τον έλεγχο του Egger για τα αλληλόμορφα S versus L.



#### Για τους γονότυπους LL versus SS+SL

- metabias odl1 stdl1, gr(b)

Έλεγχος με την μέθοδο του Begg

- metabias odl1 stdl1, gr(e)

Έλεγχος την μέθοδο του Egger

- metareg odl1 stdl1, level(95) wsse(stdl1)

Έλεγχος με την μέθοδο της μετά-παλινδρόμησης

**Πίνακας 14 : Τα αποτελέσματα από τον έλεγχο του Begg και του Egger για τους γονότυπους LL versus SS+SL.**

##### Begg's Test

adj. Kendall's Score (P-Q) = -2

Std. Dev. of Score = 2.94

Number of Studies = 4

z = -0.68

Pr > |z| = 0.497

z = 0.34 (continuity corrected)

Pr > |z| = 0.734 (continuity corrected)

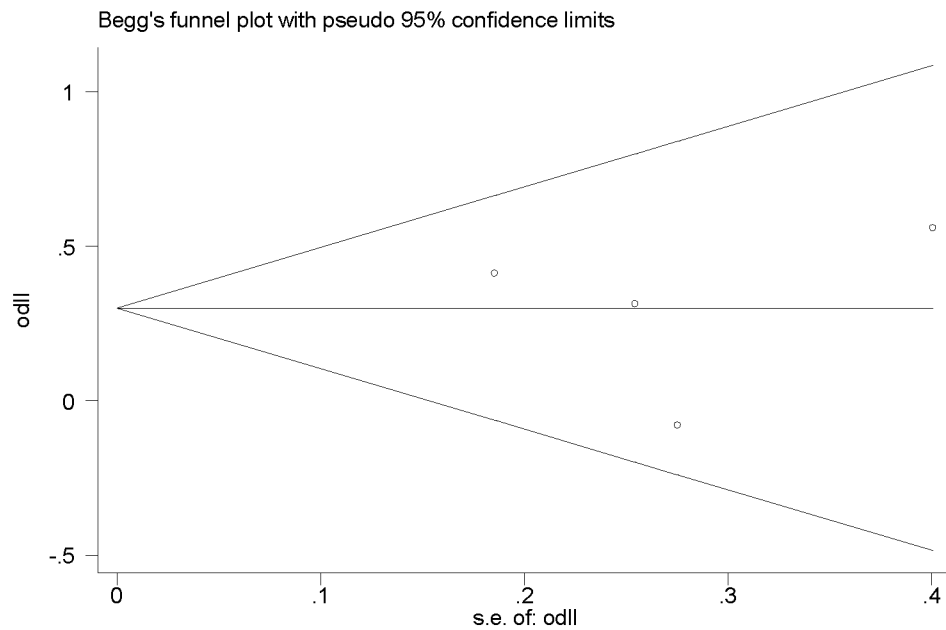
##### Egger's test

Std_Eff	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
slope	.3839136	.5583226	0.69	0.563	-2.018354 2.786182
bias	-.3457132	2.230384	-0.16	0.891	-9.942279 9.250853

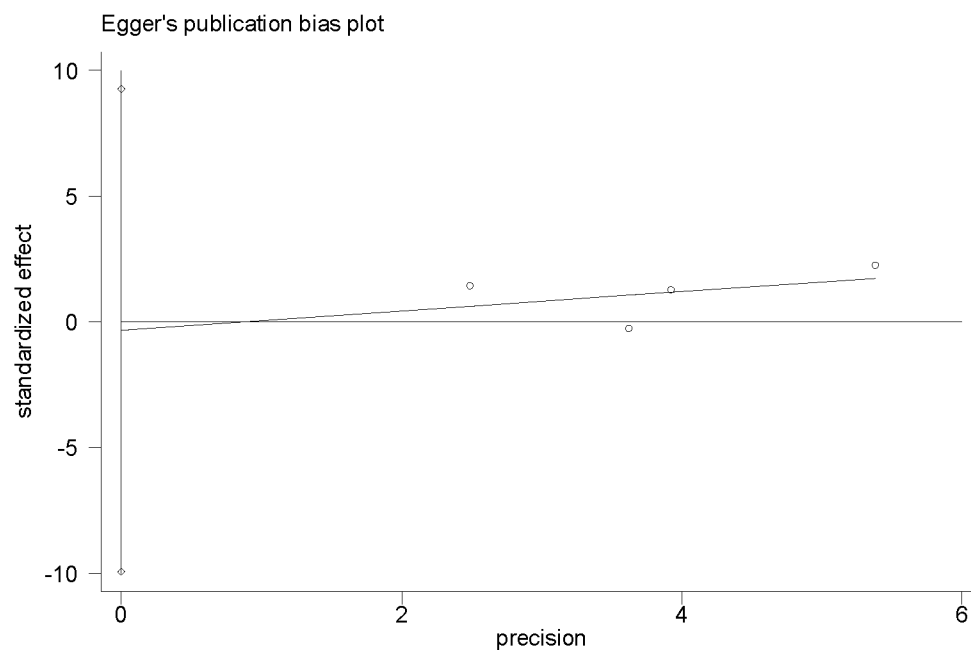
**Πίνακας 15: Τα αποτελέσματα για τον έλεγχο της ετερογένειας με τον έλεγχο της μετά – παλινδρόμησης για τους γονότυπους LL versus SS+SL.**

Meta-analysis regression	No of studies =	4			
	tau^2 method	reml			
	tau^2 estimate =	.0117			
Successive values of tau^2 differ by less than 10^-4 :convergence achieved					
	Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
Stdor	-.1744915	2.090461	-0.08	0.933	-4.271721 3.922738
_cons	.3378879	.5342635	0.63	0.527	-.7092492 1.385025

**Εικόνα 13: Το διάγραμμα με τον έλεγχο του Begg για τους γονότυπους LL versus SS+SL.**



**Εικόνα 14: Το διάγραμμα με τον έλεγχο του Egger για τους γονότυπους LL versus SS+SL.**



### Για τους γονότυπους LL+SL versus SS

- metabias odss stdss, gr(b)

Έλεγχος με την μέθοδο του Begg

- metabias odss stdss, gr(e)

Έλεγχος την μέθοδο του Egger

- metareg odss stdss, level(95) wsse(stdss)

Έλεγχος με την μέθοδο της μετά-παλινδρόμησης

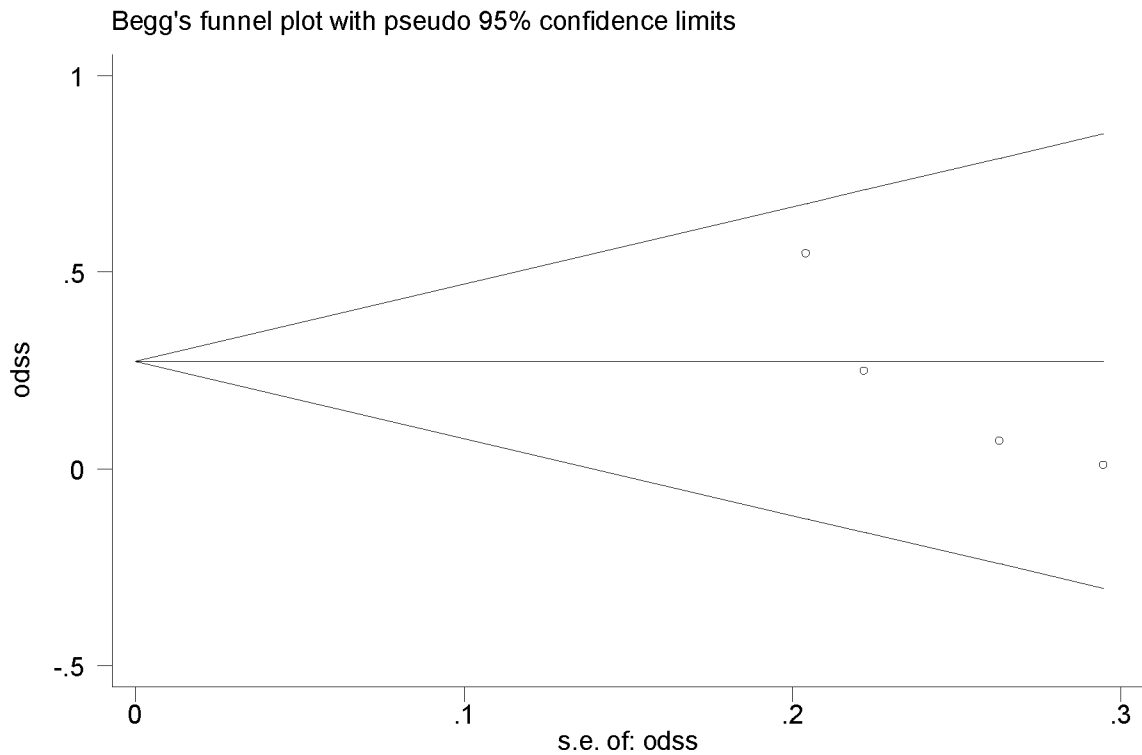
**Πίνακας 16 : Τα αποτελέσματα από τον έλεγχο του Begg και του Egger για τους γονότυπους LL +SL versus SS.**

Begg's Test						
adj. Kendall's Score (P-Q) = -6						
Std. Dev. of Score = 2.94						
Number of Studies = 4						
z = -2.04						
Pr >  z  = 0.042						
z = 1.70 (continuity corrected)						
Pr >  z  = 0.089 (continuity corrected)						
Egger's test						
Std_Eff	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
slope	1.655612	.4340778	3.81	0.062	-.2120738	3.523298
bias	-5.84526	1.818364	-3.21	0.085	-13.66905	1.978531

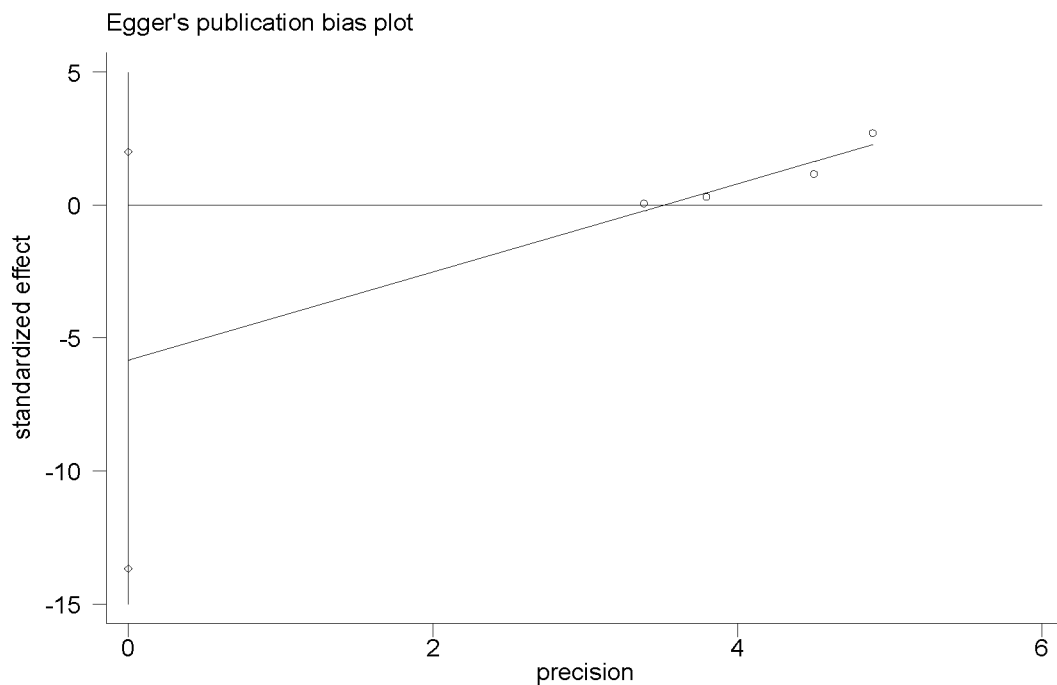
**Πίνακας 17: Τα αποτελέσματα για τον έλεγχο της ετερογένειας με τον έλεγχο της μετά – παλινδρόμησης για τους γονότυπους LL+SL versus SS.**

Meta-analysis regression						
No of studies = 4						
tau^2 method reml						
tau^2 estimate = 0						
Successive values of tau^2 differ by less than 10^-4 :convergence achieved						
	Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]	
Stdor	-5.845259	3.56648	-1.64	0.101	-12.83543	1.144914
_cons	1.655612	.8513859	1.94	0.052	-.0130739	3.324298

**Εικόνα 15: Το διάγραμμα με τον έλεγχο του Begg για τους γονότυπους LL+SL versus SS.**



**Εικόνα 16: Το διάγραμμα με τον έλεγχο του Egger για τους γονότυπους LL+SL versus SS.**



### Για τα αλληλόμορφα 4R- versus 4R+

- metabias oral stdor, gr(b)

Έλεγχος με την μέθοδο του Begg

- metabias oral stdor, gr(e)

Έλεγχος την μέθοδο του Egger

- metareg oral stdor, level(95) wsse(stdor)

Έλεγχος με την μέθοδο της μετά-παλινδρόμησης

**Πίνακας 18 : Τα αποτελέσματα από τον έλεγχο του Begg και του Egger για τα αλληλόμορφα 4R- versus 4R+.**

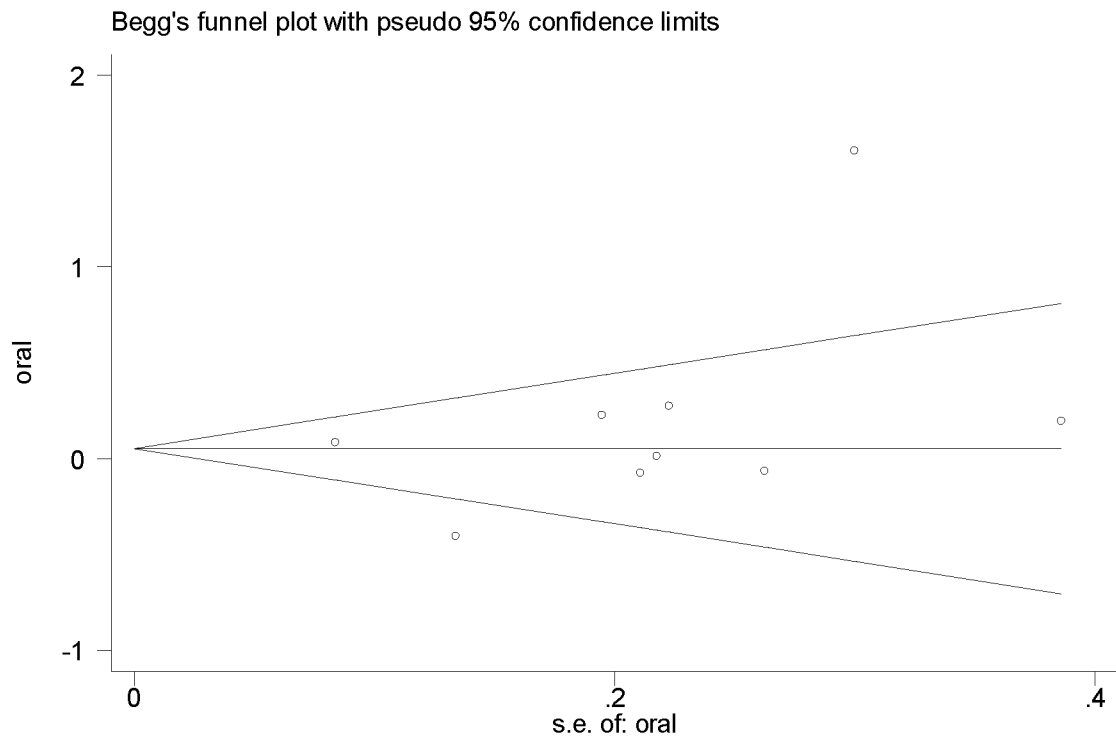
Begg's Test						
adj. Kendall's Score (P-Q) = 10						
Std. Dev. of Score =		9.59				
Number of Studies =		9				
z =		1.04				
Pr >  z  =		0.297				
z =		0.94 (continuity corrected)				
Pr >  z  =		0.348 (continuity corrected)				
Egger's test						
Std_Eff	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
slope	-.2051998	.284105	-0.72	0.494	-.8770013	.4666017
bias	1.71146	1.693808	1.01	0.346	-2.29376	5.71668

**Πίνακας 19: Τα αποτελέσματα για τον έλεγχο της ετερογένειας με τον έλεγχο της μετά – παλινδρόμησης για τα αλληλόμορφα 4R- versus 4R+.**

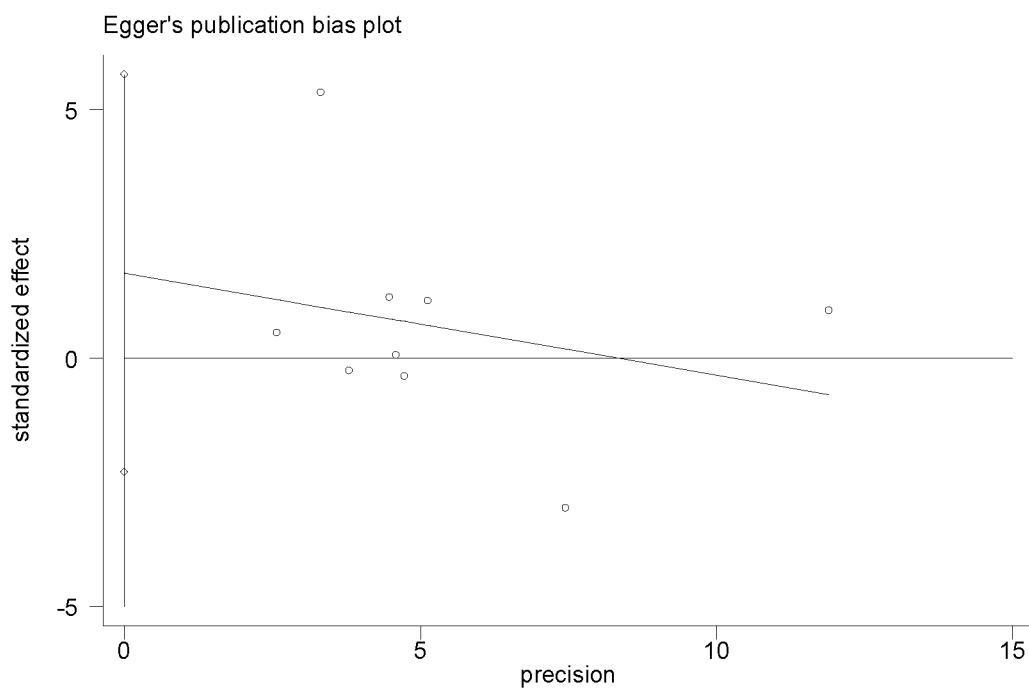
Meta-analysis regression						No of studies = 9	
						tau^2 method	reml
						tau^2 estimate =	0.1843
Successive values of tau^2 differ by less than 10^-4 :convergence achieved							
		Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]	
Stdor		2.855309	2.020276	1.41	0.158	-1.10436	6.814978
_cons		-.4354095	.4571137	-0.95	0.341	-1.331336	.4605168



**Εικόνα 17: Το διάγραμμα με τον έλεγχο του Begg για τα αλληλόμορφα 4R- versus 4R+.**



**Εικόνα 18: Το διάγραμμα με τον έλεγχο του Egger για τα αλληλόμορφα 4R- versus 4R+.**



### Για τους γονότυπους 4R- versus 4R+

- metabias or std, gr(b)

Έλεγχος με την μέθοδο του Begg

- metabias oral stdor, gr(e)

Έλεγχος την μέθοδο του Egger

- metareg or std, level(95) wsse(stdor)

Έλεγχος με την μέθοδο της μετά-παλινδρόμησης

**Πίνακας 20 : Τα αποτελέσματα από τον έλεγχο του Begg και του Egger για τους γονοτύπους 4R- versus 4R+.**

#### Begg's Test

```
adj. Kendall's Score (P-Q) = 4
Std. Dev. of Score = 9.59
Number of Studies = 9
      z = 0.42
    Pr > |z| = 0.677
      z = 0.31 (continuity corrected)
    Pr > |z| = 0.754 (continuity corrected)
```

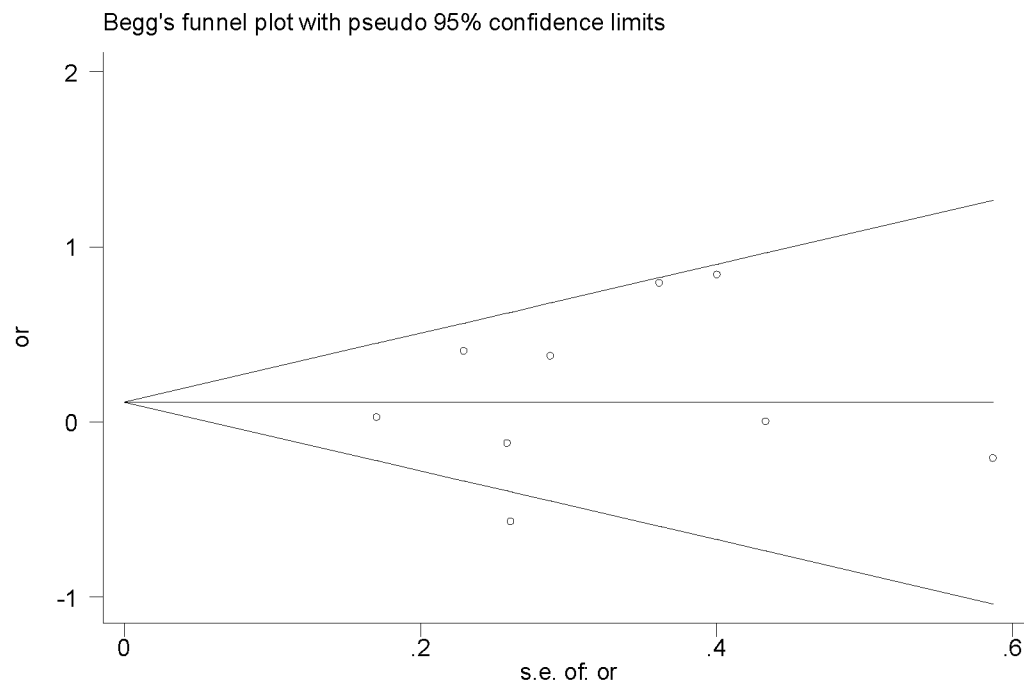
#### Egger's test

Std_Eff	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
slope	-.1403322	.4328011	-0.32	0.755	-1.163744 .8830799
bias	.9659113	1.559436	0.62	0.555	-2.721569 4.653392

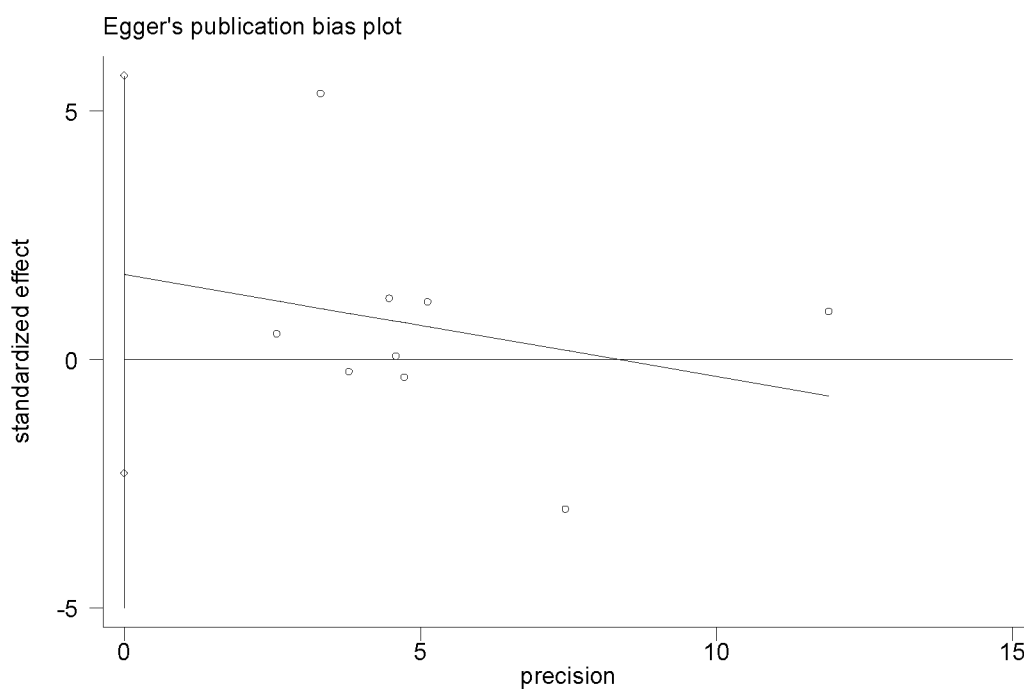
**Πίνακας 19: Τα αποτελέσματα για τον έλεγχο της ετερογένειας με τον έλεγχο της μετά - παλινδρόμησης για τους γονοτύπους 4R- versus 4R+.**

Meta-analysis regression	No of studies =	9			
	tau^2 method	reml			
	tau^2 estimate =	0.1224			
Successive values of tau^2 differ by less than 10^-4 :convergence achieved					
	Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
std	.71899	1.505896	0.48	0.633	-2.232512 3.670492
_cons	-.0613929	.4754714	-0.13	0.897	-.9932997 .8705138

**Εικόνα 19: Το διάγραμμα με τον έλεγχο του Begg για τους γονότυπους 4R- versus 4R+.**



**Εικόνα 20: Το διάγραμμα με τον έλεγχο του Egger για τους γονότυπους 4R- versus 4R+.**



## ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑ-ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗΣ

Για τα αλληλόμορφα του γονιδίου L versus S του γονιδίου SHBG

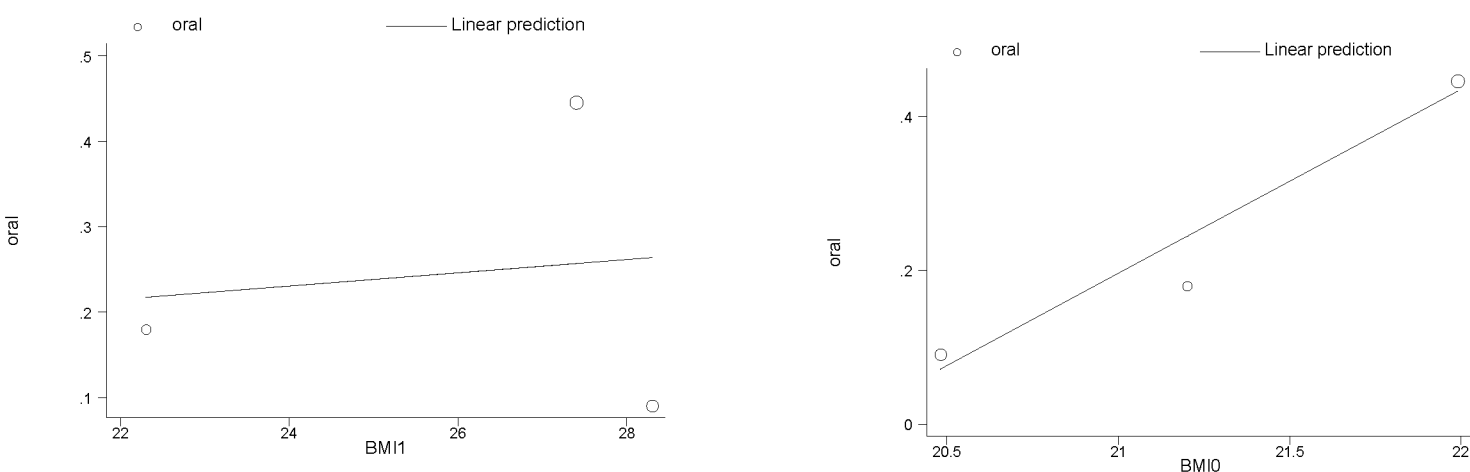
Για τον δείκτη μάζας σώματος

Meta-analysis regression					No of studies = 3	
					tau^2 method	reml
					tau^2 estimate =	0.0519
Successive values of tau^2 differ by less than 10^-4 :convergence achieved						
		Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
bmi1		.0077399	.0636289	0.12	0.903	-.1169704 .1324502
_cons		.0446492	1.67873	0.03	0.979	-3.245601 3.3348998

**Πίνακας 203: Μετά-παλινδρόμηση για τον δείκτη μάζας σώματος των ασθενών**

Meta-analysis regression					No of studies = 3	
					tau^2 method	reml
					tau^2 estimate =	0
Successive values of tau^2 differ by less than 10^-4 :convergence achieved						
		Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
bmi0		.2390396	.1328295	1.80	0.072	-.0213014 .4993807
_cons		-4.824046	2.831091	-1.70	0.088	-10.37288 .7247899

**Πίνακας 21: Μετά-παλινδρόμηση για τον δείκτη μάζας σώματος των υγιών**



**Εικόνα 21: Το forest plot από meta-regression για το δείκτη μάζας σώματος στους ασθενείς (δεξιά) και για τους υγιείς (αριστερά).**

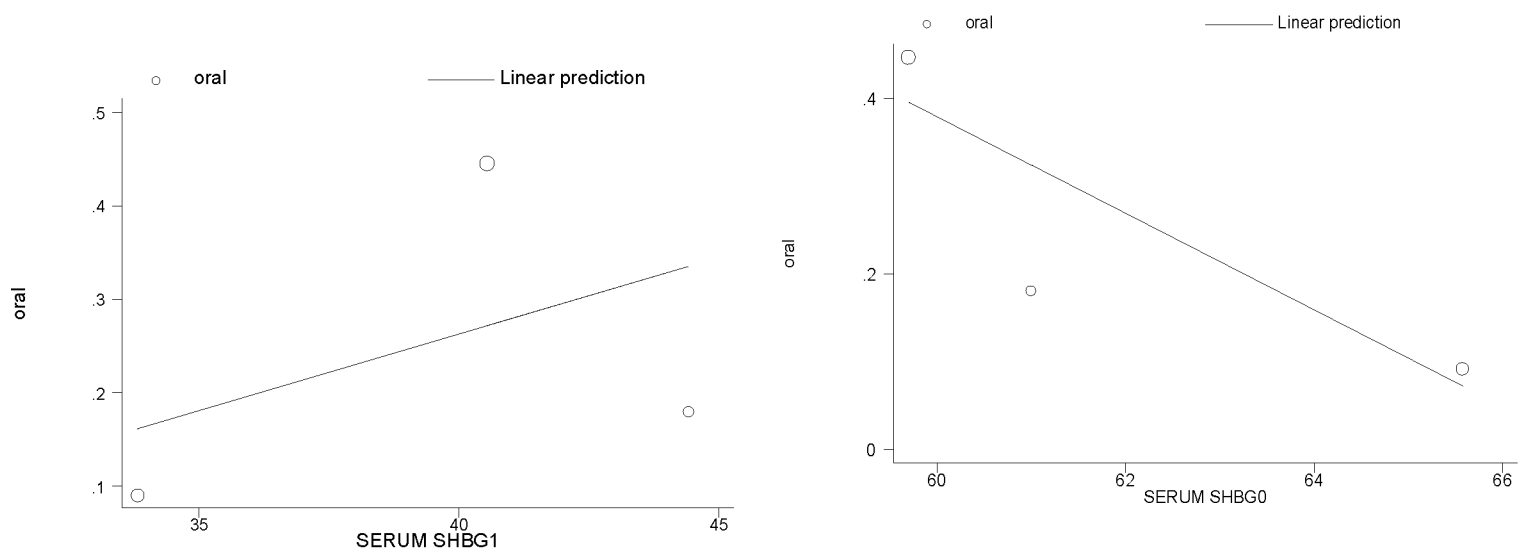
## Για τα επίπεδα της πρωτεΐνης SHBG

Meta-analysis regression					No of studies = 3	
					tau^2 method	reml
					tau^2 estimate =	0.0359
Successive values of tau^2 differ by less than 10^-4 :convergence achieved						
		Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
serumshbg1		.0164086	.0335043	0.49	0.624	-.0492587 .0820759
_cons		-.393613	1.32254	-0.30	0.766	-2.985743 2.198517

Πίνακας 22: Μετά-παλινδρόμηση για τα επίπεδα της πρωτεΐνης SHBG στους ασθενείς.

Meta-analysis regression					No of studies = 3	
					tau^2 method	reml
					tau^2 estimate =	0
Successive values of tau^2 differ by less than 10^-4 :convergence achieved						
		Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
Serumshbg0		-.054924	.0335707	-1.64	0.102	-.1207213 .0108734
_cons		3.674226	2.083704	1.76	0.078	-.4097582 7.758211

Πίνακας 23: Μετά-παλινδρόμηση για τα επίπεδα της πρωτεΐνης SHBG στους υγιείς.



Εικόνα 22: Meta-regression για τα επίπεδα της πρωτεΐνης SHBG στους ασθενείς (δεξιά) και για τους υγιείς (αριστερά)

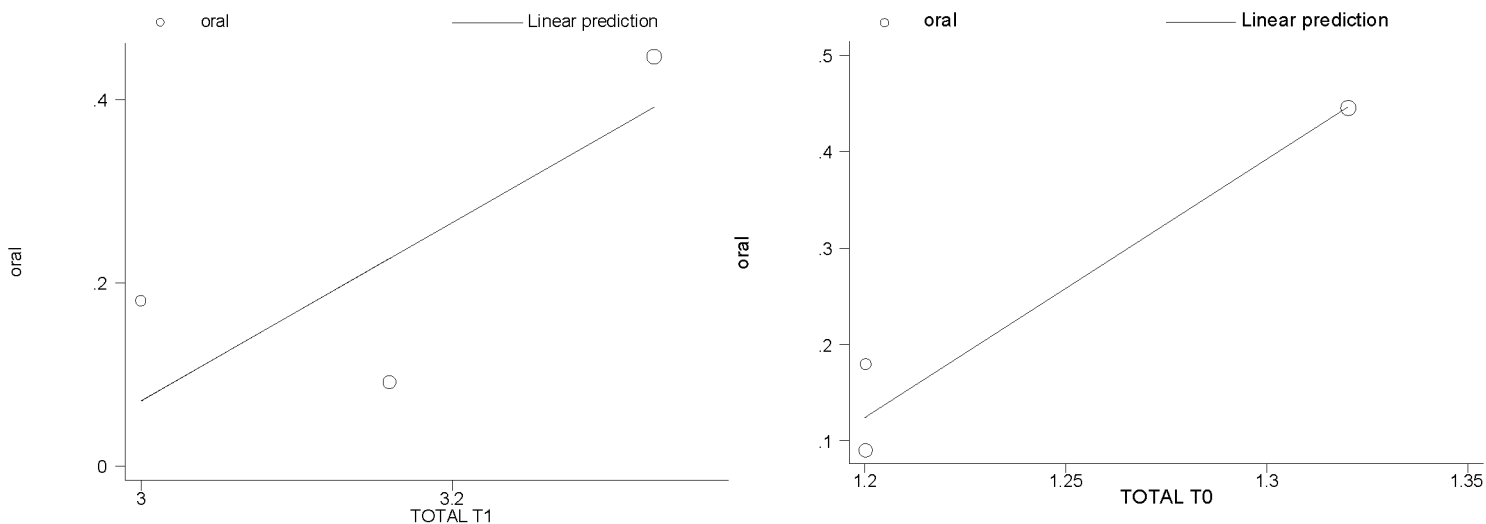
## Για την ολική τεστοστερόνη

Meta-analysis regression					No of studies = 3	
					tau^2 method	reml
					tau^2 estimate =	0.0063
Successive values of tau^2 differ by less than 10 <sup>-4</sup> :convergence achieved						
		Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
totalt1		.9709033	.780546	1.24	0.214	-.5589388 2.500745
_cons		-2.841299	2.496714	-1.14	0.255	-7.734769 2.052172

**Πίνακας 24: Μετά-παλινδρόμηση για την ολική τεστοστερόνη στους ασθενείς.**

Meta-analysis regression					No of studies = 3	
					tau^2 method	reml
					tau^2 estimate =	0
Successive values of tau^2 differ by less than 10 <sup>-4</sup> :convergence achieved						
		Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
totalt0		2.686031	1.492242	1.80	0.072	-.2387099 5.610772
_cons		-3.099366	1.873022	-1.65	0.098	-6.770422 .5716906

**Πίνακας 25: Μετά-παλινδρόμηση για την ολική τεστοστερόνη στους υγιείς**



**Εικόνα 23 : Meta-regression για τα επίπεδα της προτεΐνης SHBG στους ασθενείς (δεξιά) και για τους υγιείς (αριστερά).**

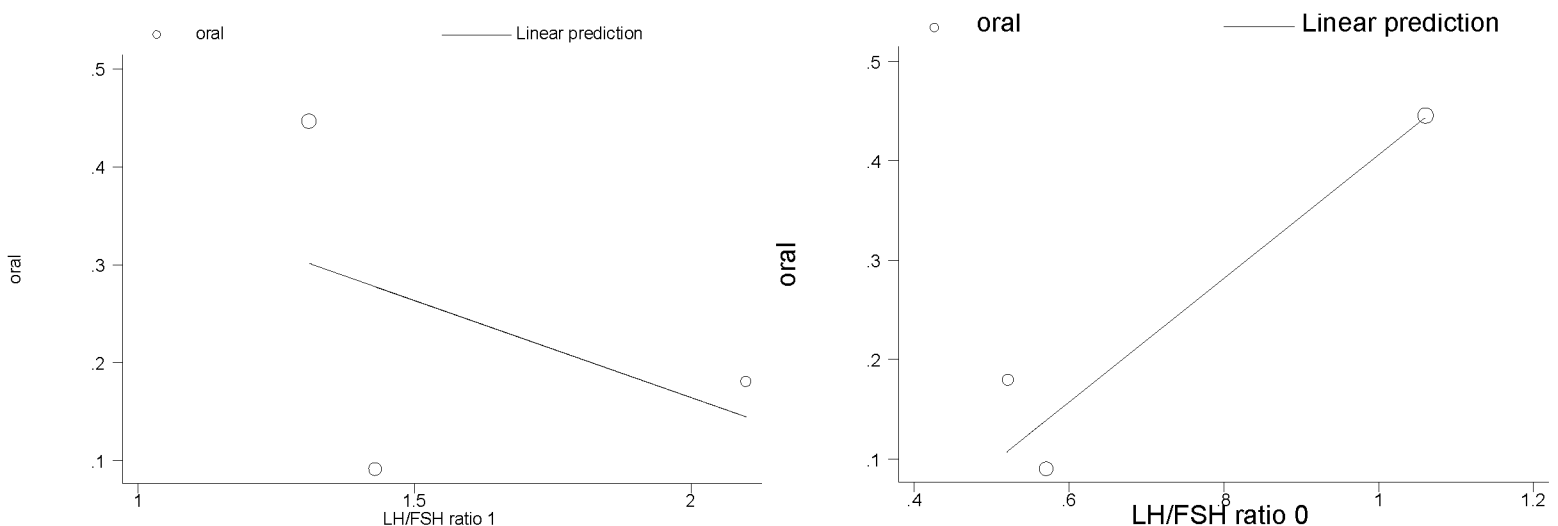
Για τον λόγο της ωχρινοτρόπου προς την θυλακιοτρόπο ορμόνη (LH/FSH)

Meta-analysis regression					No of studies = 3	
					tau^2 method	reml
					tau^2 estimate =	0.0401
Successive values of tau^2 differ by less than 10 <sup>-4</sup> :convergence achieved						
		Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
lhfsratio1		-.1978687	.4456455	-0.44	0.657	-1.071318 .6755804
_cons		.5601497	.7149368	0.78	0.433	-.8411008 1.9614

**Πίνακας 26: Μετά-παλινδρόμηση για LH/FSH στους ασθενείς.**

Meta-analysis regression					No of studies = 3	
					tau^2 method	reml
					tau^2 estimate =	0
Successive values of tau^2 differ by less than 10 <sup>-4</sup> :convergence achieved						
		Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
Lhfshratio0		.6218151	.3512952	1.77	0.077	-.0667109 1.310341
_cons		-.2163254	.2878833	-0.75	0.452	-.7805663 .3479155

**Πίνακας 27: Μετά-παλινδρόμηση για LH/FSH στους υγιείς.**



**Εικόνα 24: Meta-regression για LH/FSH στους ασθενείς (δεξιά) και για τους υγιείς (αριστερά).**

### Για τους γονότυπους LL versus SS+SL

#### Για τον δείκτη μάζας σώματος

- metareg odl1 bmi1, level(95) wsse(stdl1)
- metareg odl1 bmi0, level(95) wsse(stdl1)

Meta-analysis regression					No of studies = 3	
					tau^2 method	reml
					tau^2 estimate =	0.053
Successive values of tau^2 differ by less than 10^-4 :convergence achieved						
		Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
bmi1		-.0788761	.0928234	-0.85	0.395	-.2608065 .1030544
_cons		2.385614	2.486147	0.96	0.337	-2.487145 7.258373

**Πίνακας 284: Μετά-παλινδρόμηση για τον δείκτη μάζας σώματος των ασθενών**

Meta-analysis regression					No of studies = 3	
					tau^2 method	reml
					tau^2 estimate =	0
Successive values of tau^2 differ by less than 10^-4 :convergence achieved						
		Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
bmi0		.2926913	.2171815	1.35	0.178	-.1329767 .7183592
_cons		-5.990047	4.666762	-1.28	0.199	-15.13673 3.156639

**Πίνακας 29: Μετά-παλινδρόμηση για τον δείκτη μάζας σώματος των υγιών**



### Για τα επίπεδα της πρωτεΐνης SHBG

- metareg odl1 serumshbg1, level(95) wsse(stdl1)
- metareg odl1 serumshbg0, level(95) wsse(stdl1)

Meta-analysis regression					No of studies = 3	
					tau^2 method	reml
					tau^2 estimate =	0
Successive values of tau^2 differ by less than 10^-4 :convergence achieved						
		Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
serumshbg1		.0658147	.0407315	1.62	0.106	-.0140175 .1456469
_cons		2.283046	1.602749	-1.42	0.154	-5.424377 .8582854

**Πίνακας 30: Μετά-παλινδρόμηση για τα επίπεδα της πρωτεΐνης SHBG στους ασθενείς.**

Meta-analysis regression					No of studies = 3	
					tau^2 method	reml
					tau^2 estimate =	0
Successive values of tau^2 differ by less than 10^-4 :convergence achieved						
		Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
Serumshbg0		-.0859858	.0563713	-1.53	0.127	-.1964716 .0244999
_cons		5.581545	3.467943	1.61	0.108	-1.215499 12.37859

**Πίνακας 31: Μετά-παλινδρόμηση για τα επίπεδα της πρωτεΐνη SHBG στους υγιείς.**

### Για την ολική τεστοστερόνη

- metareg odl1 totalt1, level(95) wsse(stdl1)
- metareg odl1 totalt0, level(95) wsse(stdl1)

Meta-analysis regression					No of studies = 3	
					tau^2 method	reml
					tau^2 estimate = 0.1239	
Successive values of tau^2 differ by less than 10^-4 :convergence achieved						
		Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
totalt1		-.0616205	1.981224	-0.03	0.975	-3.944749 3.821508
_cons		.4769314	6.334281	0.08	0.940	-11.93803 12.89189

**Πίνακας 32: Μετά-παλινδρόμηση για την ολική τεστοστερόνη στους ασθενείς.**

Meta-analysis regression					No of studies = 3	
					tau^2 method	reml
					tau^2 estimate = 0.1239	
Successive values of tau^2 differ by less than 10^-4 :convergence achieved						
		Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
Totalt0		2.389361	2.44443	0.98	0.328	-2.401633 7.180355
_cons		-2.742822	3.112459	-0.88	0.378	-8.843129 3.357485

**Πίνακας 33: Μετά-παλινδρόμηση για την ολική τεστοστερόνη στους υγιείς**

Για τον λόγο της ωχρινοτρόπου προς την θυλακιοτρόπο ορμόνη (LH/FSH)

- metareg odl1 lhfshratio1, level(95) wsse(stdl1)
- metareg odl1 lhfshratio1, level(95) wsse(stdl1)

Meta-analysis regression					No of studies = 3	
					tau^2 method	reml
					tau^2 estimate = 0.1075	
Successive values of tau^2 differ by less than 10^-4 :convergence achieved						
		Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
lhfshratio1		.3638925	.7890007	0.46	0.645	-1.18252 1.910305
_cons		-.2777263	1.233904	-0.23	0.822	-2.696134 2.140681

**Πίνακας 34: Μετά-παλινδρόμηση για LH/FSH στους ασθενείς.**

Meta-analysis regression					No of studies = 3	
					tau^2 method	reml
					tau^2 estimate = 0.0398	
Successive values of tau^2 differ by less than 10^-4 :convergence achieved						
		Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
Lhfshratio0		.4476589	.7543657	0.59	0.553	-1.030871 1.926189
_cons		-.07866	.6364419	-0.12	0.902	-1.326063 1.168743

**Πίνακας 35: Μετά-παλινδρόμηση για LH/FSH στους υγιείς.**

Για τους γονότυπους LL+SL versus SS

Για τον δείκτη μάζας σώματος

- `metareg odss bmi1, level(95) wsse(stdss)`
- `metareg odss bmi0, level(95) wsse(stdss)`

Meta-analysis regression					No of studies = 3	
					tau^2 method	reml
					tau^2 estimate = 0.0212	
Successive values of tau^2 differ by less than 10^-4 :convergence achieved						
		Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
bmi1		.0513406	.0628877	0.82	0.414	-.0719171 .1745983
_cons		-1.036722	1.663785	-0.62	0.533	-4.297681 2.224237

**Πίνακας 36: Μετά-παλινδρόμηση για τον δείκτη μάζας σώματος των ασθενών**

Meta-analysis regression					No of studies = 3	
					tau^2 method	reml
					tau^2 estimate = 0	
Successive values of tau^2 differ by less than 10^-4 :convergence achieved						
		Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
bmi0		.2108581	.1993636	1.06	0.290	-.1798875 .6016036
_cons		-4.159462	4.243106	-0.98	0.327	-12.4758 4.156873

**Πίνακας 37: Μετά-παλινδρόμηση για τον δείκτη μάζας σώματος των υγιών**

### Για τα επίπεδα της πρωτεΐνης SHBG

- metareg odss serumshbg1, level(95) wsse(stdss)
- metareg odss serumshbg0, level(95) wsse(stdss)

Meta-analysis regression					No of studies = 3	
					tau^2 method	reml
					tau^2 estimate = 0.0631	
Successive values of tau^2 differ by less than 10^-4 :convergence achieved						
		Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
serumshbg1		-.0072297	.0456394	-0.16	0.874	-.0966813 .082222
_cons		.5904139	1.806424	0.33	0.744	-2.950112 4.130939

**Πίνακας 38: Μετά-παλινδρόμηση για τα επίπεδα της πρωτεΐνης SHBG στους ασθενείς.**

Meta-analysis regression					No of studies = 3	
					tau^2 method	reml
					tau^2 estimate = 0.0361	
Successive values of tau^2 differ by less than 10^-4 :convergence achieved						
		Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
Serumshbg0		-.0320929	.0663055	-0.48	0.628	-.1620492 .0978634
_cons		2.303654	4.120184	0.56	0.576	-5.771759 10.37907

**Πίνακας 39: Μετά-παλινδρόμηση για τα επίπεδα της πρωτεΐνης SHBG στους υγιείς.**

### Για την ολική τεστοστερόνη

- metareg odss totalt1, level(95) wsse(stdss)
- metareg odss totalt0, level(95) wsse(stdss)

Meta-analysis regression					No of studies = 3	
					tau^2 method	reml
					tau^2 estimate =	0
Successive values of tau^2 differ by less than 10^-4 :convergence achieved						
		Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
totalt1		1.475262	.9955741	1.48	0.138	-.476027 3.426552
_cons		-4.379924	3.17856	-1.38	0.168	-10.60979 1.849939

**Πίνακας 40: Μετά-παλινδρόμηση για την ολική τεστοστερόνη στους ασθενείς.**

Meta-analysis regression					No of studies = 3	
					tau^2 method	reml
					tau^2 estimate =	0
Successive values of tau^2 differ by less than 10^-4 :convergence achieved						
		Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
Totalt0		3.101251	2.213215	1.40	0.161	-1.236571 7.4390725
_cons		-3.547173	2.767293	-1.28	0.200	-8.970968 1.876621

**Πίνακας 41: Μετά-παλινδρόμηση για την ολική τεστοστερόνη στους υγιείς**

Για τον λόγο της ωχρινοτρόπου προς την θυλακιοτρόπο ορμόνη (LH/FSH)

- metareg odss lhfshratio1, level(95) wsse(stdss)
- metareg odss lhfshratio0, level(95) wsse(stdss)

Meta-analysis regression					No of studies = 3	
					tau^2 method	reml
					tau^2 estimate =	0
Successive values of tau^2 differ by less than 10^-4 :convergence achieved						
		Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
lhfshratio1		-.5149985	.406936	-1.27	0.206	-1.312578 .2825814
_cons		1.122276	.6424657	1.75	0.081	-.1369333 2.381486

**Πίνακας 42: Μετά-παλινδρόμηση για LH/FSH στους ασθενείς.**

Meta-analysis regression					No of studies = 3	
					tau^2 method	reml
					tau^2 estimate =	0
Successive values of tau^2 differ by less than 10^-4 :convergence achieved						
		Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
Lhfshratio0		.7446854	.518488	1.44	0.151	-.2715325 1.760903
_cons		-.2380236	.4139309	-0.58	0.565	-1.049313 .5732661

**Πίνακας 43: Μετά-παλινδρόμηση για LH/FSH στους υγιείς.**

## Για τα αλληλόμορφα 4R- versus 4R+

### Για τον δείκτη μάζας σώματος

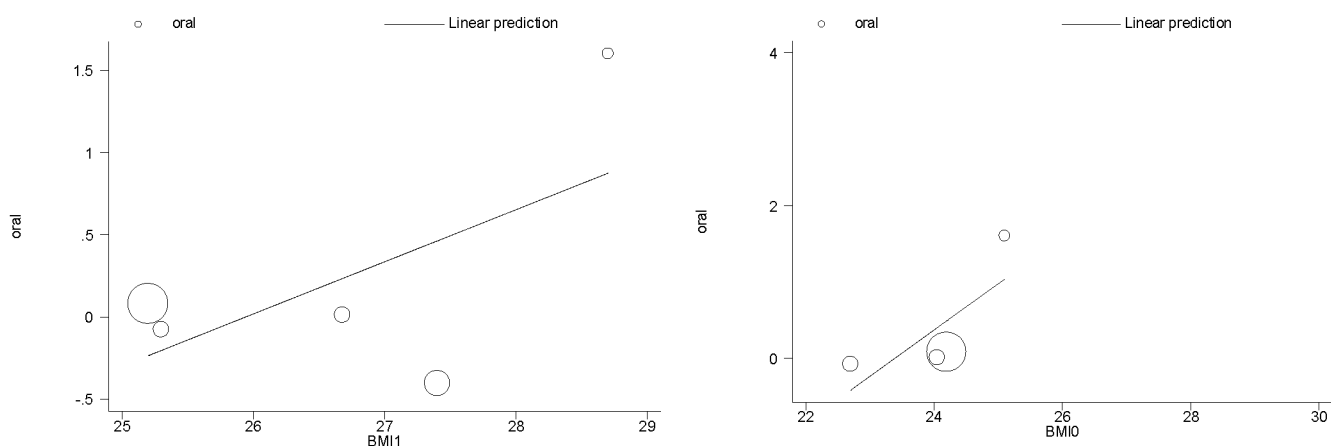
- metareg oral bmi1, level(95) wsse(stdor)
- metareg oral bmi0, level(95) wsse(stdor)

Meta-analysis regression					No of studies = 5	
					tau^2 method	reml
					tau^2 estimate = 0.4394	
Successive values of tau^2 differ by less than 10^-4 :convergence achieved						
	Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]	
bmi1	.3173432	.2382071	1.33	0.183	-.1495341	.7842206
_cons	-8.234517	6.345177	-1.30	0.194	-20.67083	4.201801

**Πίνακας 44: Μετά-παλινδρόμηση για τον δείκτη μάζας σώματος των ασθενών**

Meta-analysis regression					No of studies = 4	
					tau^2 method	reml
					tau^2 estimate = 0.319	
Successive values of tau^2 differ by less than 10^-4 :convergence achieved						
		Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
bmi0		.6060768	.3595305	1.69	0.092	-.09859 1.310744
_cons		-14.17674	8.629502	- 1.64	0.100	-31.09025 2.736776

**Πίνακας 45: Μετά-παλινδρόμηση για τον δείκτη μάζας σώματος των υγιών**



**Εικόνα 25: Τα διαγράμματα από meta-regression για το δείκτη μάζας σώματος στους ασθενείς (αριστερά) και για τους υγιείς (δεξιά).**



## Για την ηλικία

- `metareg oral age1, level(95) wsse(stdor)`
- `metareg oral age0, level(95) wsse(stdor)`

```

Meta-analysis regression                                No of studies =    6
                                                         tau^2 method      reml
                                                         tau^2 estimate = 0.4713

Successive values of tau^2 differ by less than 10^-4 :convergence achieved

      |      Coef.      Std. Err.      z    P>|z|      [95% Conf. Interval]
age1  |      .0461058    .0805213     0.57   0.567     - .111713      .2039247
_cons |     -1.174602    2.440003    -0.48   0.630     -5.95692     3.607715

```

**Πίνακας 46: Μετά-παλινδρόμηση για την ηλικία στους ασθενείς.**

```

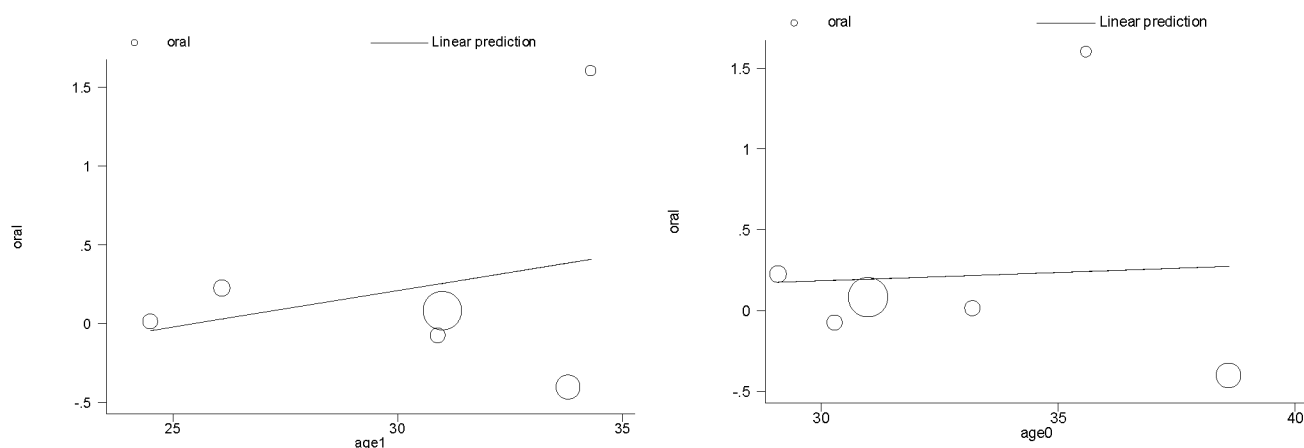
Meta-analysis regression                                No of studies =    6
                                                         tau^2 method      reml
                                                         tau^2 estimate = 0.5042

Successive values of tau^2 differ by less than 10^-4 :convergence achieved

      |      Coef.      Std. Err.      z    P>|z|      [95% Conf. Interval]
age0  |      .0103882    .0910431     0.11   0.909     - .1680531    .1888295
_cons |     -1.1283008    3.014842    -0.04   0.966     -6.037282    5.780681

```

**Πίνακας 47: Μετά-παλινδρόμηση για την ηλικία στους υγιείς.**



**Εικόνα 26: Τα διαγράμματα από meta-regression για την ηλικία στους ασθενείς (αριστερά) και για τους υγιείς (δεξιά).**

### Για την ολική τεστοστερόνη

- metareg oral totalt1, level(95) wsse(stdor)
- metareg oral totalt0, level(95) wsse(stdor)

```

Meta-analysis regression
No of studies = 7
tau^2 method reml
tau^2 estimate = 0.042
Successive values of tau^2 differ by less than 10^-4 :convergence achieved
      |   Coef.   Std. Err.   z    P>|z|   [95% Conf. Interval]
totalt1 |   .0073152   .0018267   4.00   0.000    .003735    .0108954
_cons   |  -.5165561   .2097719  -2.46   0.014   -.9277014   -.1054109

```

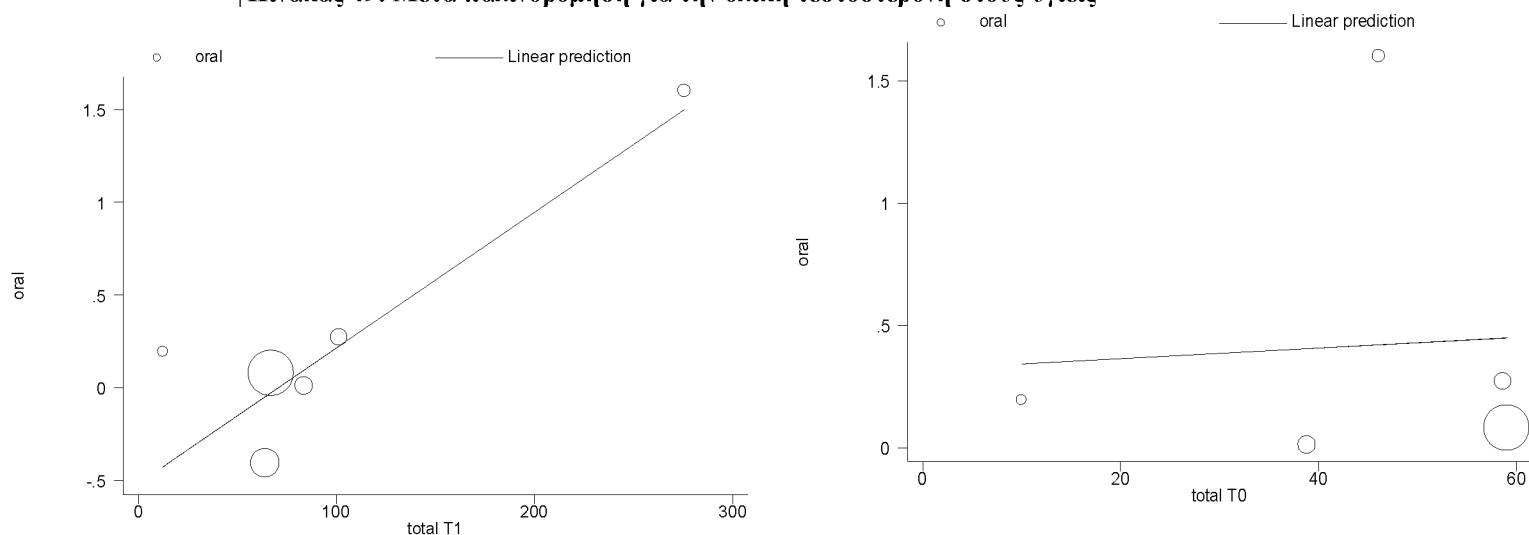
**Πίνακας 48: Μετά-παλινδρόμηση για την ολική τεστοστερόνη στους ασθενείς.**

```

Meta-analysis regression
No of studies = 6
tau^2 method reml
tau^2 estimate = 0.3917
Successive values of tau^2 differ by less than 10^-4 :convergence achieved
      |   Coef.   Std. Err.   z    P>|z|   [95% Conf. Interval]
totalt0 |   .0021669   .0191608   0.11   0.910   -.0353875    .0397214
_cons   |   .3212312   .9025521   0.36   0.722   -1.447738    2.090201

```

**Πίνακας 49: Μετά-παλινδρόμηση για την ολική τεστοστερόνη στους υγιείς**



**Εικόνα 27: Meta-regression για την ολική τεστοστερόνη στους ασθενείς (αριστερά) και για τους υγιείς (δεξιά)**

### Για τη μέση αναλογία ισχίων (WHR)

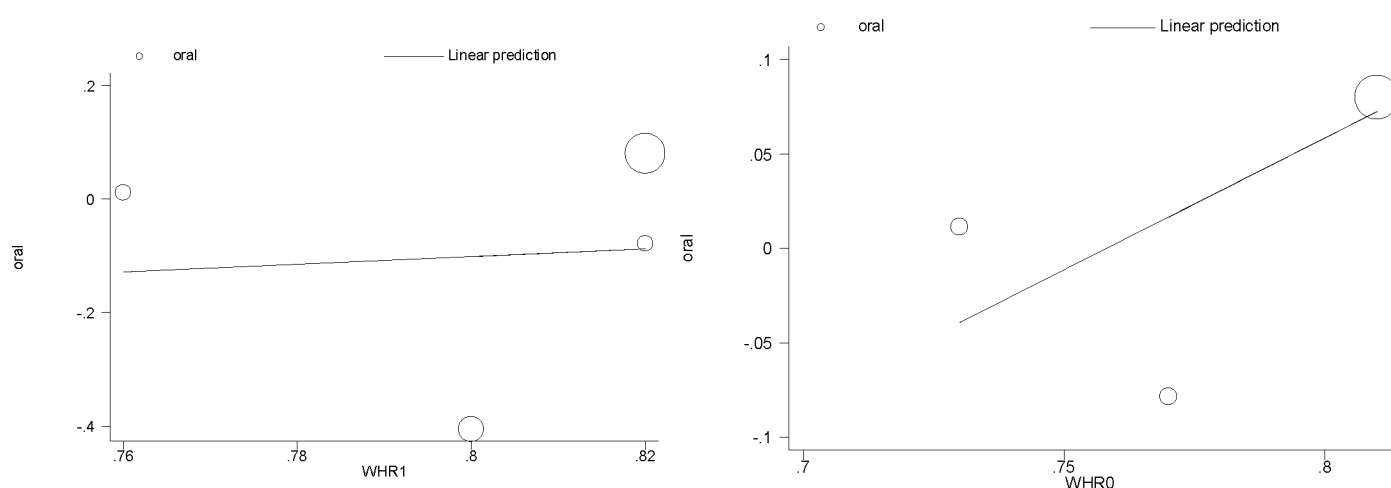
- metareg oral whr1, level(95) wsse(stdor)
- metareg oral whr0, level(95) wsse(stdor)

Meta-analysis regression					No of studies = 4	
					tau^2 method	reml
					tau^2 estimate = 0.597	
Successive values of tau^2 differ by less than 10^-4 :convergence achieved						
		Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
whr1		.6725463	6.390721	0.11	0.916	-11.85304 13.19813
_cons		-.6397669	5.130774	-0.12	0.901	-10.6959 9.416365

**Πίνακας 50: Μετά-παλινδρόμηση για τη μέση αναλογία ισχίων στους ασθενείς.**

Meta-analysis regression					No of studies = 3	
					tau^2 method	reml
					tau^2 estimate = 0	
Successive values of tau^2 differ by less than 10^-4 :convergence achieved						
		Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
whr0		1.397978	2.721788	0.51	0.608	-3.936629 6.732585
_cons		-1.060033	2.167883	-0.49	0.625	-5.309006 3.18894

**Πίνακας 51: Μετά-παλινδρόμηση για τη μέση αναλογία ισχίων στους υγιείς.**

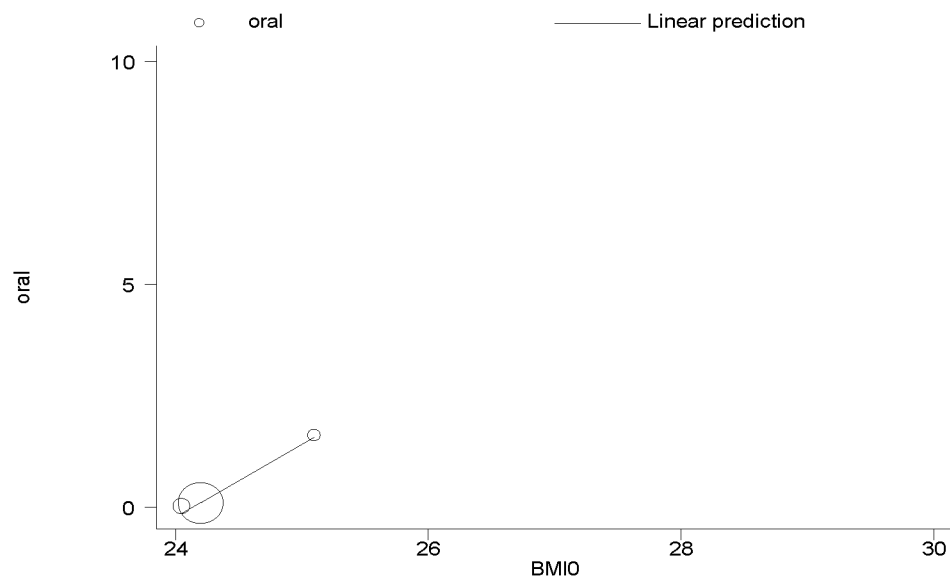


**Εικόνα 28: Meta-regression για τη μέση αναλογία ισχίων στους ασθενείς (αριστερά) και για τους υγιείς (δεξιά)**

## Για το δείκτη μάζας σώματος των Καυκάσιων

Meta-analysis regression					No of studies = 3	
					tau^2 method	reml
					tau^2 estimate =	0
Successive values of tau^2 differ by less than 10 <sup>-4</sup> :convergence achieved						
		Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
bmi0		1.610386	.3296249	4.89	0.000	.9643329 2.256439
_cons		-38.86588	7.990217	-4.86	0.000	-54.52642 -23.20535

**Πίνακας 52: Μετά-παλινδρόμηση για το δείκτη μάζας σώματος των υγιών Καυκάσιων.**



**Εικόνα 29: Meta-regression για το δείκτη μάζας σώματος των υγιών Καυκάσιων**

## Για τους γονότυπους 4R- versus 4R+

### Για τον δείκτη μάζας σώματος

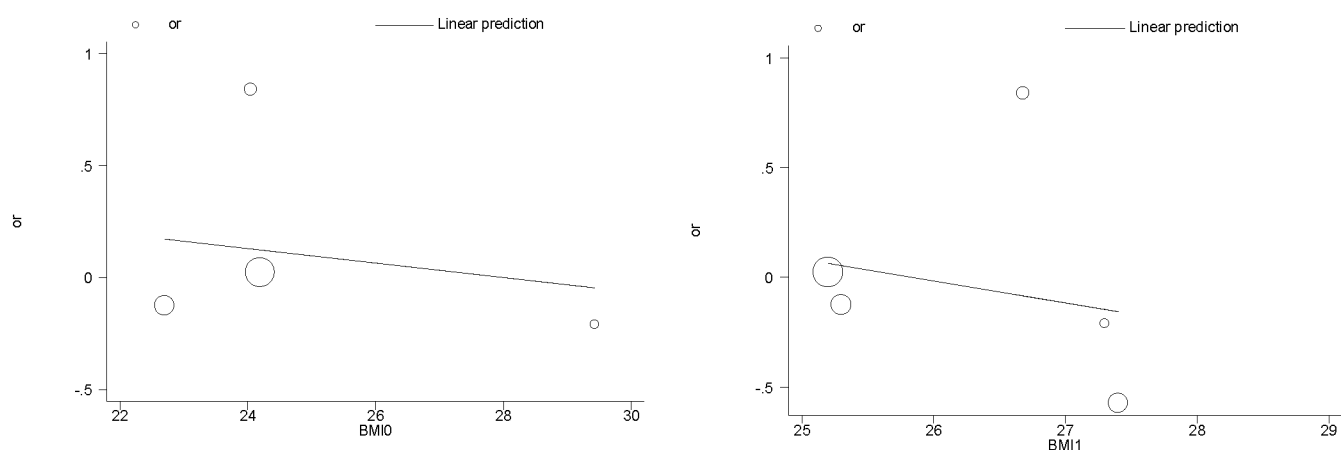
- metareg or bmi1, level(95) wsse(std)
- metareg or bmi0, level(95) wsse(std)

Meta-analysis regression					No of studies = 5	
					tau^2 method	reml
					tau^2 estimate = 0.1838	
Successive values of tau^2 differ by less than 10^-4 :convergence achieved						
		Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
bmi1		-.0993604	.2455174	-0.40	0.686	-.5805656 .3818449
_cons		2.566815	6.436288	0.40	0.690	-10.04808 15.18171

**Πίνακας 52: Μετά-παλινδρόμηση για τον δείκτη μάζας σώματος των ασθενών**

Meta-analysis regression					No of studies = 4	
					tau^2 method	reml
					tau^2 estimate = 0.142	
Successive values of tau^2 differ by less than 10^-4 :convergence achieved						
		Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
bmi0		-.0321627	.1226953	-0.26	0.793	-.272641 .2083156
_cons		.9013367	3.003241	0.30	0.764	-4.984908 6.787582

**Πίνακας 53: Μετά-παλινδρόμηση για τον δείκτη μάζας σώματος των υγιών**



**Εικόνα 29: Τα διαγράμματα από meta-regression για το δείκτη μάζας σώματος στους ασθενείς (δεξιά) και για τους υγιείς (αριστερά).**

### Για την ηλικία

- metareg or age1, level(95) wsse(std)
- metareg or age0, level(95) wsse(std)

```
Meta-analysis regression                                No of studies =    6
                                                         tau^2 method      reml
                                                         tau^2 estimate =    0
Successive values of tau^2 differ by less than 10^-4 :convergence achieved

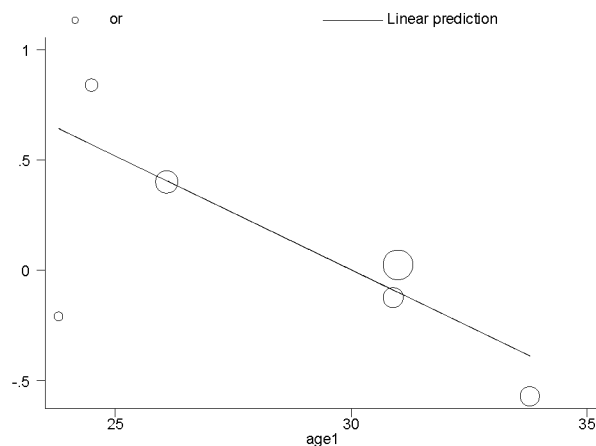
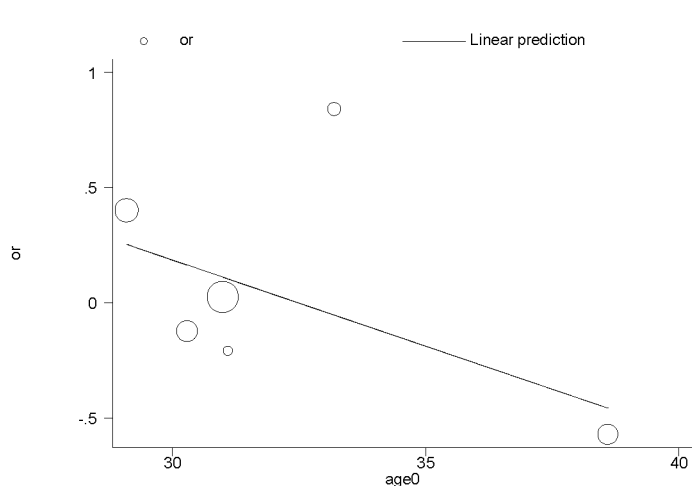
      |      Coef.      Std. Err.      z    P>|z|      [95% Conf. Interval]
age1  |   -.1030493    .0345137    -2.99   0.003    -.1706949   -.0354037
_cons |    3.095237    1.032117     3.00   0.003     1.072325    5.11815
```

**Πίνακας 54: Μετά-παλινδρόμηση για την ηλικία στους ασθενείς.**

```
Meta-analysis regression                                No of studies =    6
                                                         tau^2 method      reml
                                                         tau^2 estimate =  0.0293
Successive values of tau^2 differ by less than 10^-4 :convergence achieved

      |      Coef.      Std. Err.      z    P>|z|      [95% Conf. Interval]
age0  |   -.0747102    .0406671    -1.84   0.066    -.1544162    .0049958
_cons |    2.426029    1.308942     1.85   0.064    -.1394505    4.991508
```

**Πίνακας 55: Μετά-παλινδρόμηση για την ηλικία στους υγιείς.**



**Εικόνα 30: Τα διαγράμματα από meta-regression για την ηλικία στους ασθενείς (δεξιά) και για τους υγιείς (αριστερά).**

### Για την ολική τεστοστερόνη

- metareg or totalt1, level(95) wsse(std)
- metareg or totalt0, level(95) wsse(std)

```
Meta-analysis regression                                No of studies =    6
                                                         tau^2 method      reml
                                                         tau^2 estimate = 0.0633

Successive values of tau^2 differ by less than 10^-4 :convergence achieved

      |   Coef.      Std. Err.      z    P>|z|    [95% Conf. Interval]
totalt1 |   .0240647    .013864    1.74   0.083    - .0031083   .0512377
_cons   |  -1.683476    1.084539   -1.55   0.121    -3.809133   .4421808
```

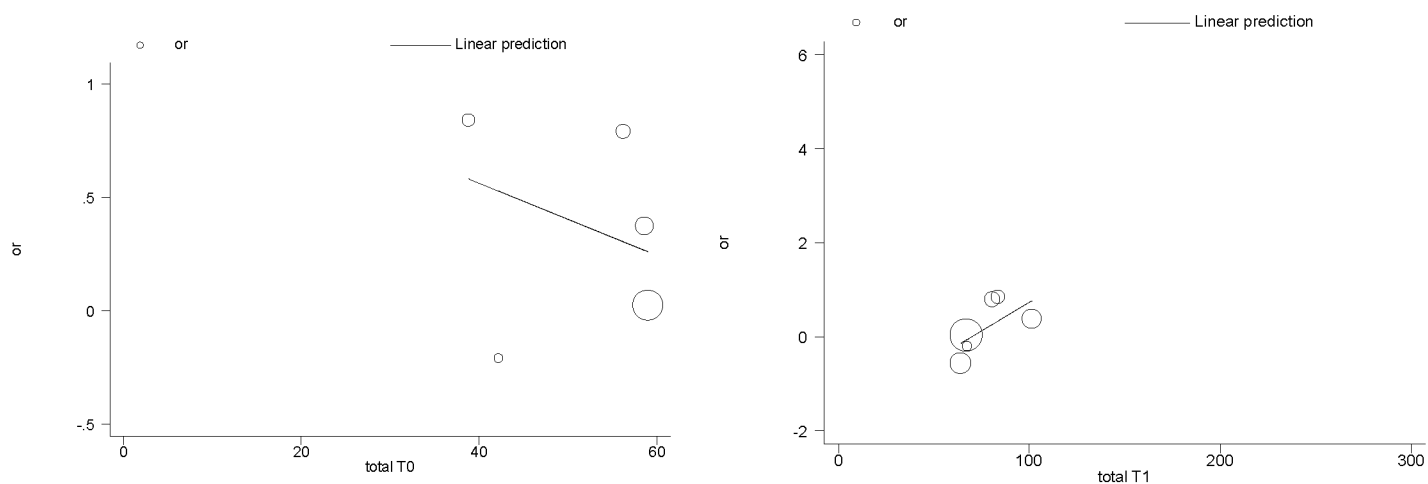
**Πίνακας 56: Μετά-παλινδρόμηση για την ολική τεστοστερόνη στους ασθενείς.**

```
Meta-analysis regression                                No of studies =    5
                                                         tau^2 method      reml
                                                         tau^2 estimate = 0.0401

Successive values of tau^2 differ by less than 10^-4 :convergence achieved

      |   Coef.      Std. Err.      z    P>|z|    [95% Conf. Interval]
totalt0 |  -.0158824    .0235711   -0.67   0.500    - .062081   .0303162
_cons   |   1.19698     1.286132    0.93   0.352    -1.323793   3.717752
```

**Εικόνα 3: Μετά-παλινδρόμηση για την ολική τεστοστερόνη στους υγιείς**



**Εικόνα 31: Meta-regression για την ολική τεστοστερόνη στους ασθενείς (δεξιά) και για τους υγιείς (αριστερά)**

### Για τη μέση αναλογία ισχίων (WHR)

- metareg or whr1, level(95) wsse(std)
- metareg or whr0, level(95) wsse(std)

```
Meta-analysis regression                                No of studies =    4
                                                         tau^2 method      reml
                                                         tau^2 estimate = 0.1913
Successive values of tau^2 differ by less than 10^-4 :convergence achieved

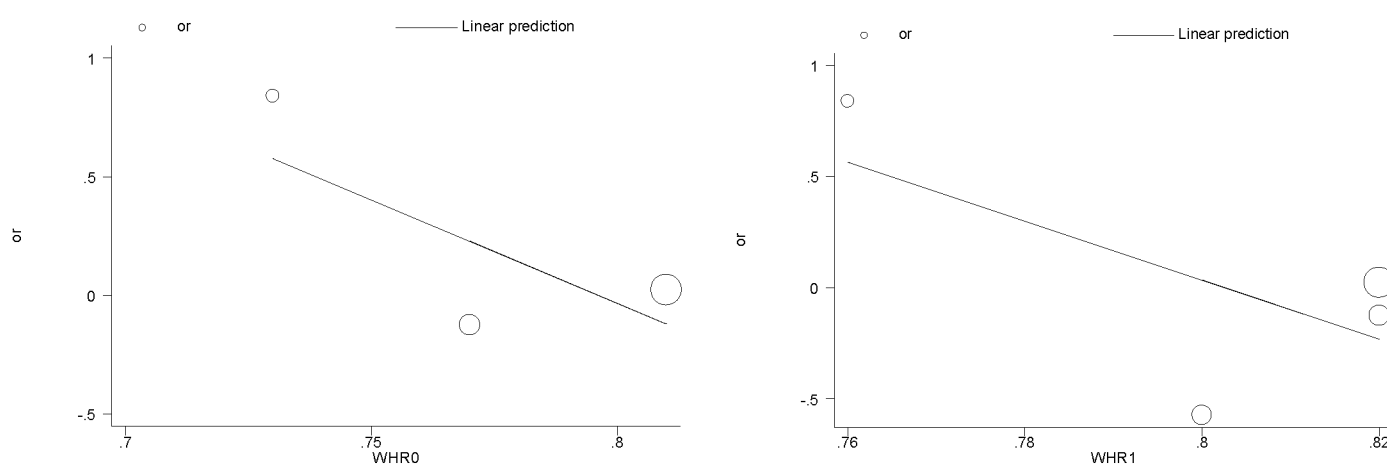
      |   Coef.      Std. Err.      z    P>|z|    [95% Conf. Interval]
whr1 |  -13.26372    11.38755    -1.16   0.244    -35.5829   9.055472
_cons |   10.64511     9.154763     1.16   0.245    -7.297896  28.58812
```

**Πίνακας 57: Μετά-παλινδρόμηση για τη μέση αναλογία ισχίων στους ασθενείς.**

```
Meta-analysis regression                                No of studies =    3
                                                         tau^2 method      reml
                                                         tau^2 estimate = 0.1255
Successive values of tau^2 differ by less than 10^-4 :convergence achieved

      |   Coef.      Std. Err.      z    P>|z|    [95% Conf. Interval]
whr0 |   -8.702235     8.164377    -1.07   0.286    -24.70412   7.299651
_cons |    6.928812     6.355823     1.09   0.276    -5.528373  19.386
```

**Πίνακας 58: Μετά-παλινδρόμηση για τη μέση αναλογία ισχίων στους υγιείς.**

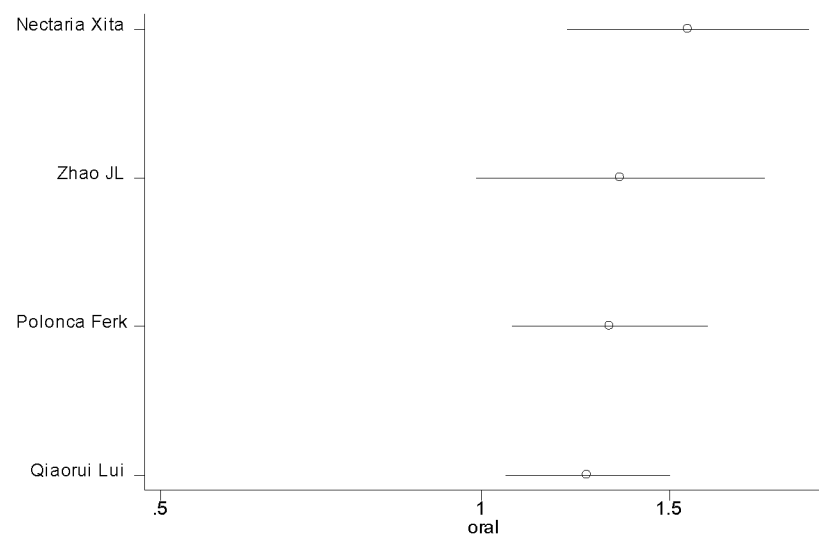


**Εικόνα 32: Meta-regression για τη μέση αναλογία ισχίων στους ασθενείς (δεξιά) και για τους υγιείς (αριστερά)**

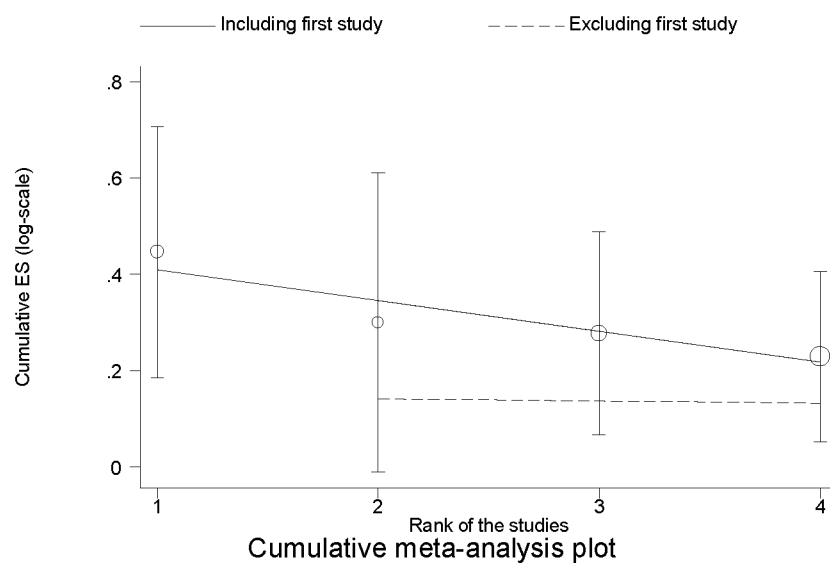


# ΑΘΡΟΙΣΤΙΚΗ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ

Για τα αλληλόμορφα L versus S

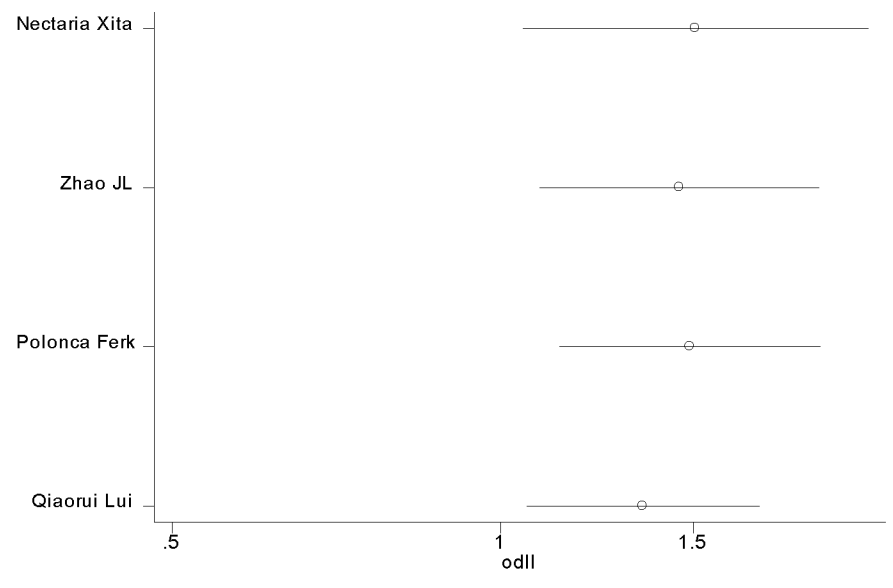


**Εικόνα 33:** Το forest plot της αθροιστικής μετά-ανάλυσης με την εντολή metacum για τα αλληλόμορφα του γονιδίου SHBG, όπου oral το log(odds ratio).

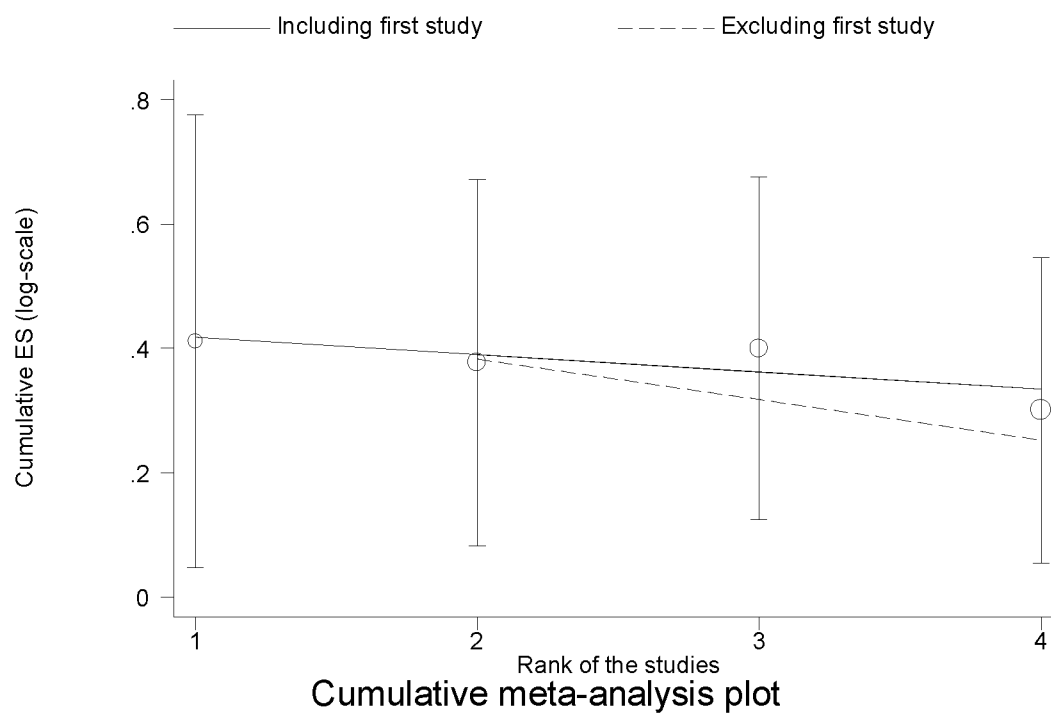


**Εικόνα 34:** Το forest plot της αθροιστικής μετά-ανάλυσης με την εντολή metatrend για τα αλληλόμορφα του γονιδίου SHBG.

Για τους γονότυπους LL versus SS+SL

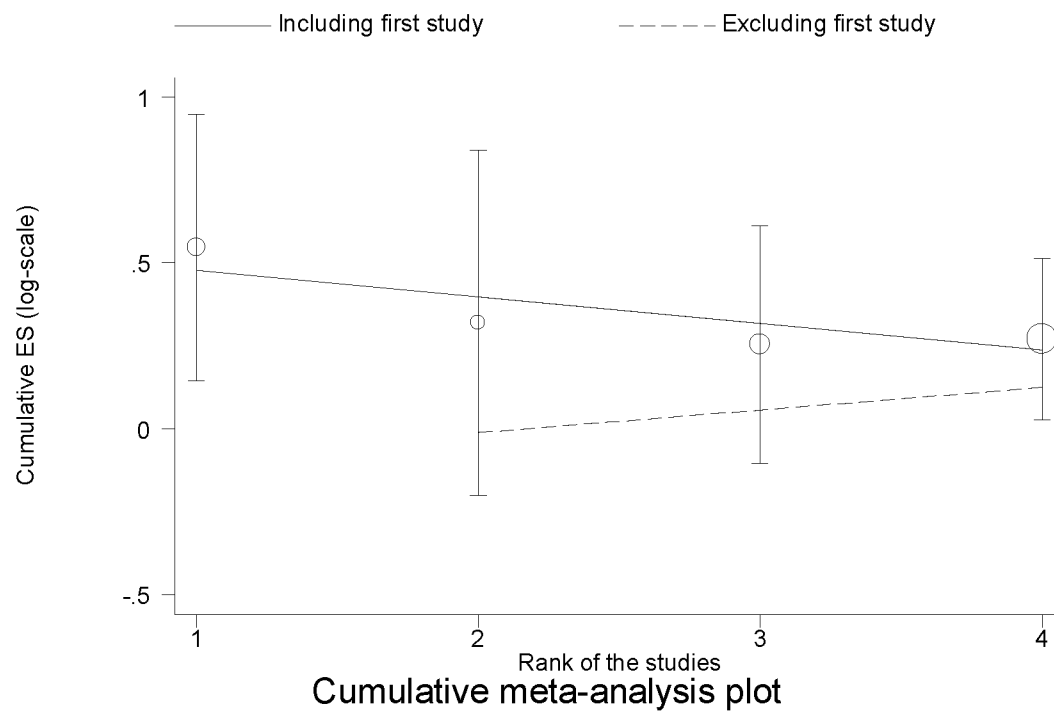


**Εικόνα 35:** Το forest plot της αθροιστικής μετά-ανάλυσης με την εντολή metacum για τους γονότυπους LL versus SS+SL του γονιδίου SHBG, όπου odll το log(odds ratio).



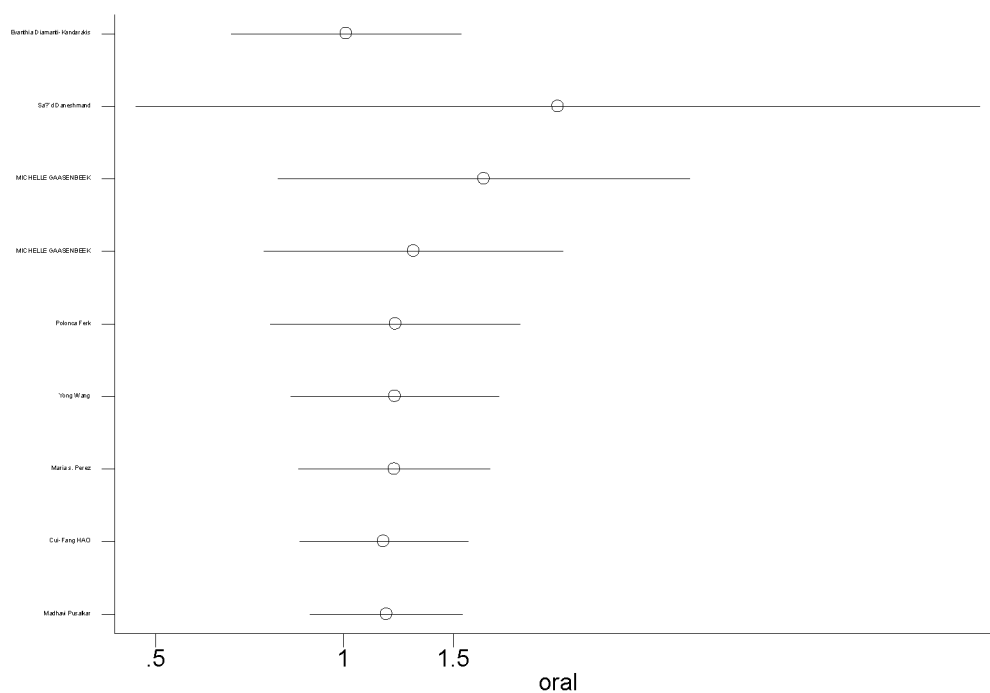
**Εικόνα 36:** Το forest plot της αθροιστικής μετά-ανάλυσης με την εντολή metatrend για τους γονότυπους LL versus SS+SL του γονιδίου SHBG.

Για τους γονότυπους LL+SL versus SS



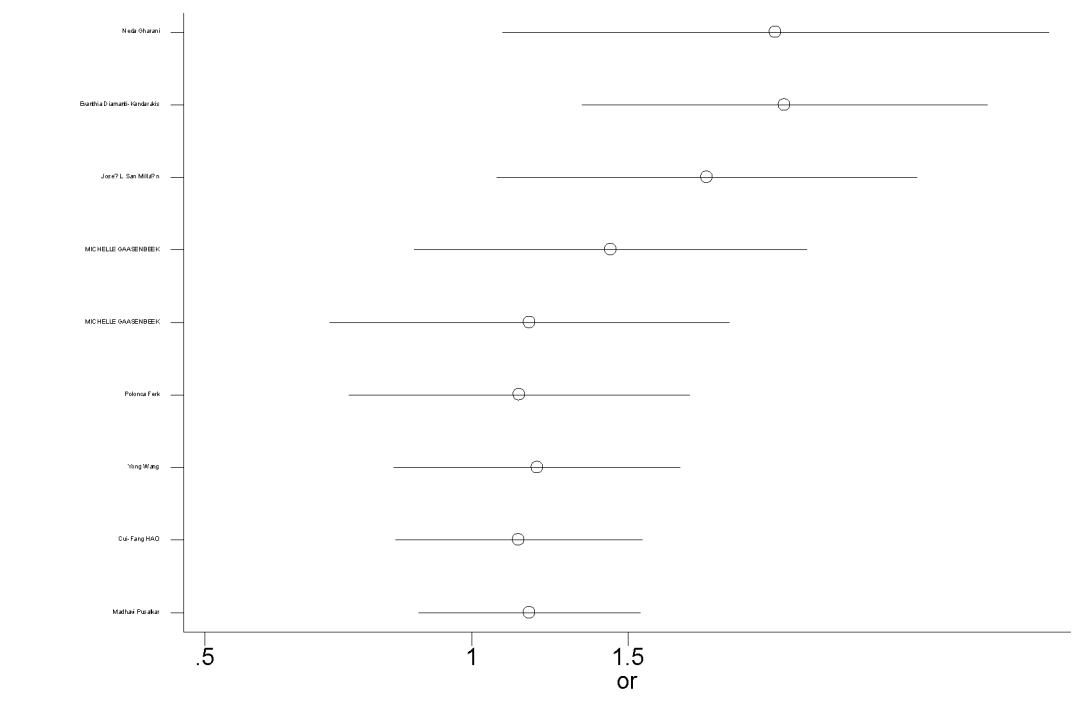
**Εικόνα 37:** Το forest plot της αθροιστικής μετά-ανάλυσης με την εντολή metatrend για τους γονότυπους LL+SL versus SS του γονιδίου SHBG.

### Για τα αλληλόμορφα 4R- versus 4R+



**Εικόνα 38:** Το forest plot της αθροιστικής μετά-ανάλυσης με την εντολή metacum για τα αλληλόμορφα 4R- versus 4R+ του γονιδίου CYP11a , όπου oral το log(odds ratio).

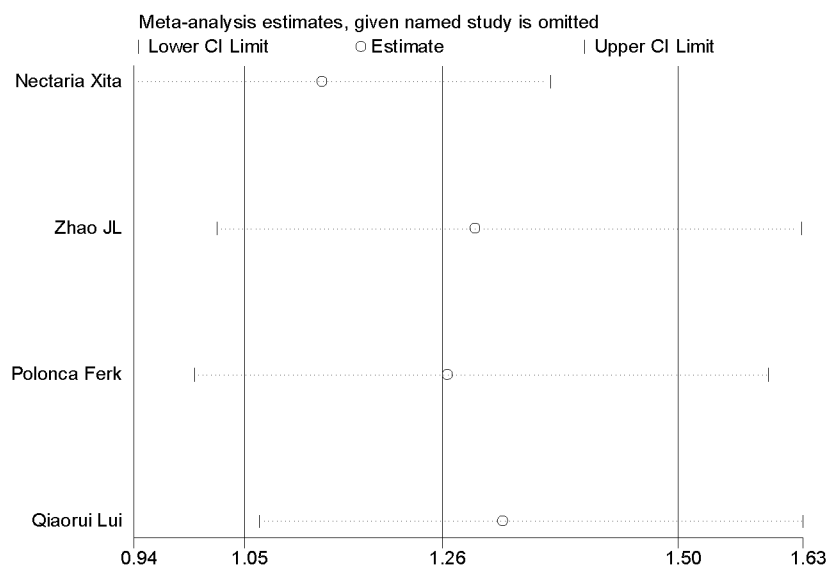
Για τους γονότυπους 4R- versus 4R+



**Εικόνα 39:** Το forest plot της αθροιστικής μετά-ανάλυσης με την εντολή metacum για τους γονότυπους 4R- versus 4R+ του γονιδίου CYP11a , όπου or το log(odds ratio).

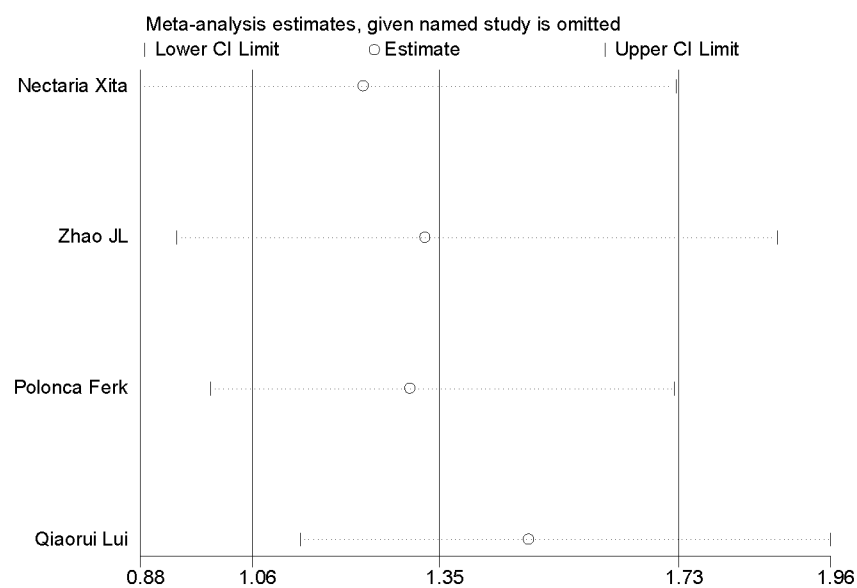
# ΑΦΑΙΡΕΤΙΚΗ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ

Για τα αλληλόμορφα L versus S



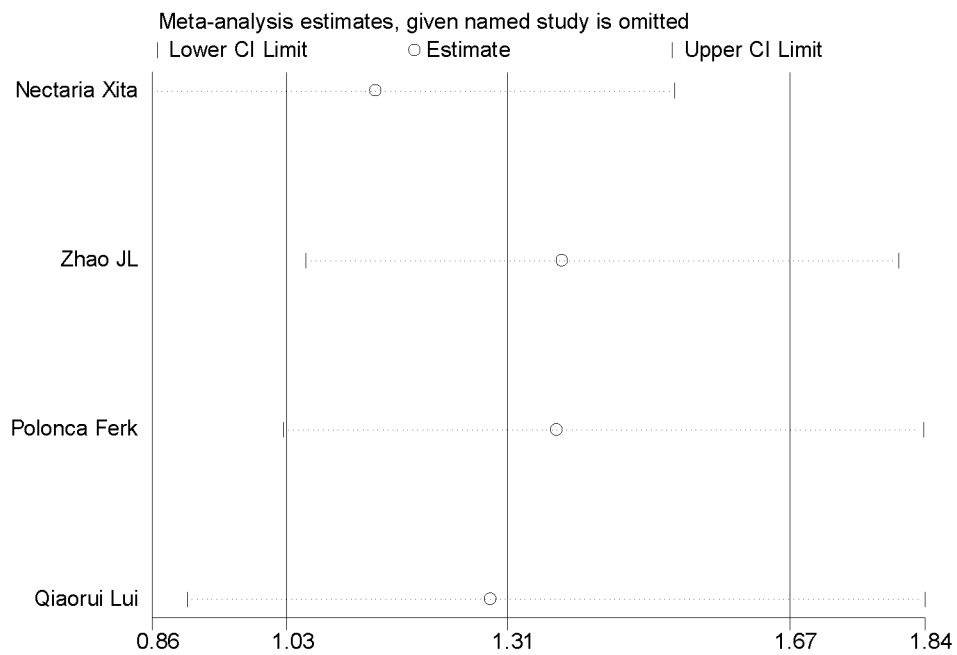
**Εικόνα 40:** Το forest plot της αφαιρετικής μετά-ανάλυσης με την εντολή metainf για τα αλληλόμορφα του γονιδίου SHBG.

Για τους γονότυπους LL versus SS+SL



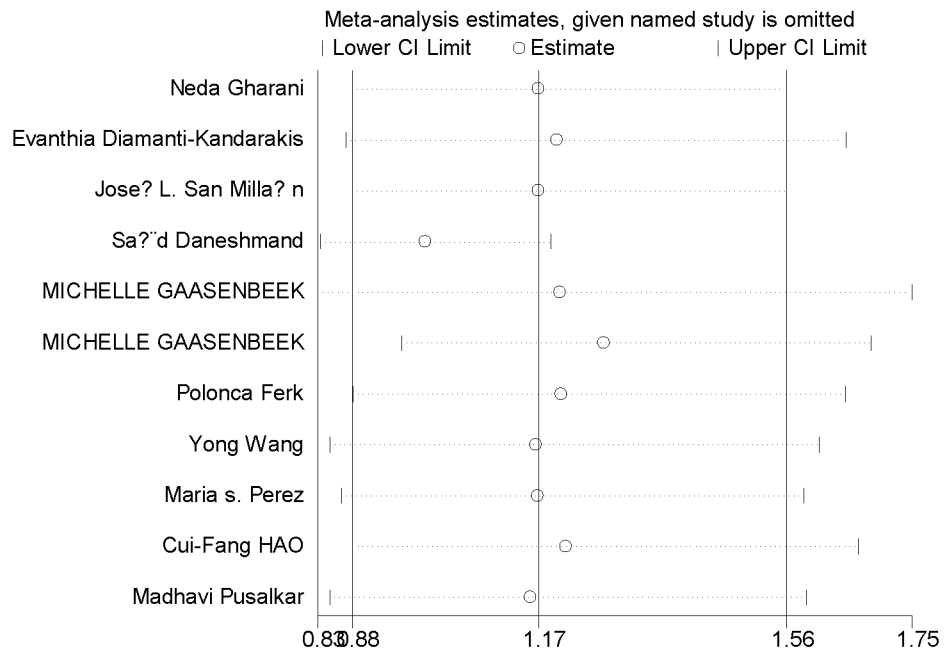
**Εικόνα 41:** Το forest plot της αφαιρετικής μετά-ανάλυσης με την εντολή metainf για τους γονότυπους LL versus SS+SL του γονιδίου SHBG.

Για τους γονότυπους LL+SL versus SS



**Εικόνα 42:** Το forest plot της αφαιρετικής μετά-ανάλυσης με την εντολή `metainf` για τους γονότυπους LL+SL versus SS του γονιδίου SHBG.

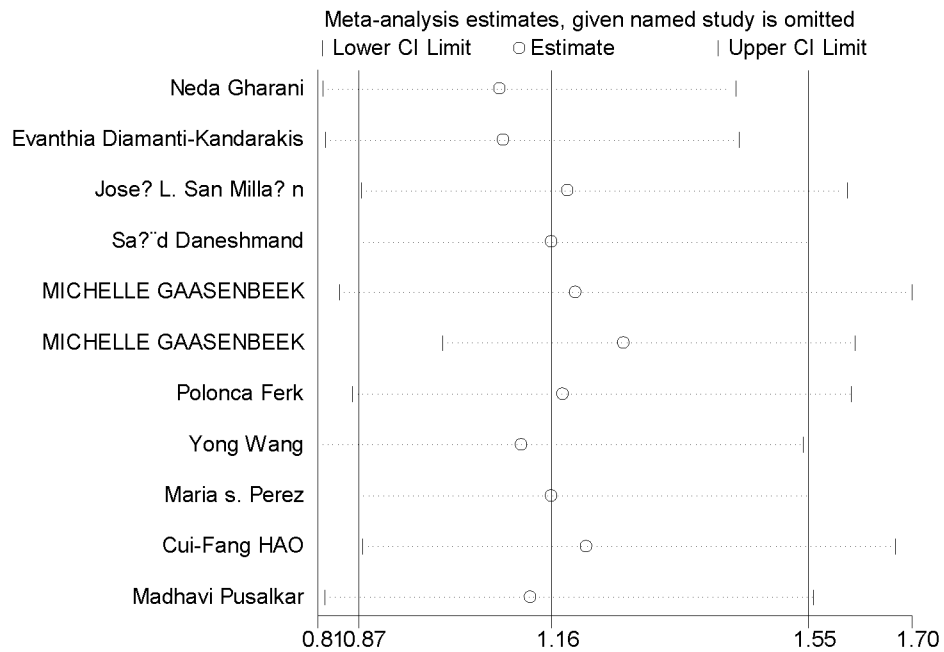
Για τα αλληλόμορφα 4R- versus 4R+ του γονιδίου CYP11a



**Εικόνα 43:** Το forest plot της αφαιρετικής μετά-ανάλυσης με την εντολή metainf για τους αλληλόμορφα 4R- versus 4R+ του γονιδίου CYP11a.



Για τους γονότυπους 4R- versus 4R+ του γονιδίου CYP11a



**Εικόνα 44:** Το forest plot της αφαιρετικής μετά-ανάλυσης με την εντολή metainf για τους γονότυπους 4R- versus 4R+ του γονιδίου CYP11a.